

**(S)-TETRAHYDROPROTOBERBERIN
OXIDASE
DAS ZENTRALE ENZYM
IN DER OXIDATION
VON BENZYLISOCHINOLIN
ALKALOIDEN**

Manfred Amann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

(S)-TETRAHYDROPROTOBERBERIN OXIDASE
DAS ZENTRALE ENZYM IN DER OXIDATION
VON BENZYLISOCHINOLIN ALKALOIDEN

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Manfred Amann
aus
München

Februar 1986

1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk

2. Referent: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1986

1. DEFINITION

1.1. Definition 1.1

1.2. Definition 1.2

1.3. Definition 1.3

1.4. Definition 1.4

1.5. Definition 1.5

2. Lemma 2.1

3. Theorem 3.1

4. Corollary 4.1

5. Proposition 5.1

6. Lemma 6.1

7. Theorem 7.1

8. Corollary 8.1

9. Proposition 9.1

10. Lemma 10.1

11. Theorem 11.1

12. Corollary 12.1

13. Proposition 13.1

14. Lemma 14.1

15. Theorem 15.1

16. Corollary 16.1

17. Proposition 17.1

18. Lemma 18.1

19. Theorem 19.1

20. Corollary 20.1

21. Proposition 21.1

22. Lemma 22.1

23. Theorem 23.1

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	16
1. Biologisches Material	16
1.1 Pflanzliches Material	16
1.2 Versuchstiere	17
1.3 Bakterien	17
2. Chemikalien	17
3. Geräte	19
4. Synthesen	20
4.1 Synthese von (R)- und (S)-Tetrahydroprotoberberinen.....	20
4.2 Synthese von 13,14-Dehydro-Berberin	21
4.3 Oxidation von Tetrahydroprotoberberinen zu Protoberberinen.....	22
4.4 Synthese von [8,14- ³ H ₂]- (R,S)-Scoulerin.	22
5. Gewinnung zellfreier Enzympräparationen	22
5.1 Aufschluß differenzierter Pflanzen	22
5.2 Aufschluß pflanzlicher Zellkulturen	23
6. Enzymtests	24
6.1 Berberinbrückenenzym	24
6.2 Leitenzyme subzellulärer Kompartimente..	24
7. Immunologische Methoden	25
7.1 Immunisierung von Kaninchen mit (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) ..	25
7.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen STOX aus Mäuseaszites	26
7.3 Radiale Immundiffusion	27
7.4 Immunelektrophorese	27
7.5 Immunelektronenmikroskopie	28
7.6 Immunoblotting	28
7.7 Radioimmunologische Bestimmung der Norretikulinenantimere	31

	Seite
8. Mikroskopische Verfahren	32
9. Proteinbestimmungen	33
10. Aminosäureanalyse	33
11. Kinetische Messung der Sauerstoff- konzentration	33
12. Bestimmung von Wasserstoffperoxid	34
13. Radioaktivitätsbestimmungen	35
14. Chromatographische Methoden	36
15. Elektrophoretische Trennverfahren.....	36
15.1 Isoelektrische Fokussierung	36
15.2 Diskontinuierliche Polyacrylamidgel- elektrophorese	37
III. ERGEBNISSE	40
1. Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)...	40
1.1 Optische Tests	40
1.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis..	43
1.3 Radioimmunologische Analyse	44
1.4 Tritium-Ausbautest	44
1.5 Vorstellung weiterer Testmöglichkeiten...	47
2. Reinigung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) aus Zellsuspensionskultur von <u>Berberis wilsoniae</u> var. <u>subcaulialata</u> Schneid.	50
2.1 Gelfiltration an Ultrogel AcA 44	50
2.2 Dye-ligand Chromatographie an Matrex Blue A	52
2.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE- Sephacel	53
2.4 Präparative Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel	55
2.5 Zusammenfassende Darstellung und Dokumen- tation der Homogenität	57
2.6 Verkürzte Anreicherungsverfahren zur präparativen Verwendung von STOX	62
2.7 Affinitätschromatographische STOX- Reinigung	63

3. Charakterisierung der (S)-Tetrahydro- protoberberin Oxidase (STOX)	70
3.1 Stereospezifität des Enzyms	70
3.2 Identifizierung der Enzymprodukte	71
3.3 Stöchiometrie der enzymatischen Oxidationsreaktion	74
3.4 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus...	80
3.5 Identifizierung des Coenzyms	85
3.6 Temperatur-Optimum	95
3.7 pH-Optimum	97
3.8 Bestimmung des isoelektrischen Punkts.....	98
3.9 Molekulargewichtsbestimmung	99
3.10 Aminosäureanalyse	102
3.11 Substratspezifität	104
3.12 Hemmstoffe	113
3.13 Multiple Enzymformen	118
4. Vorkommen der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)	121
4.1 Taxonomische Verbreitung	121
4.1.1 Nachweis der STOX-Aktivität in Roh- extrakten	121
4.1.2 Immunologischer Nachweis des STOX- Proteins	125
4.2 Kinetik des Gehalts an STOX in Zellkultur von <u>Berberis wilsoniae</u> var. <u>subcaulialata</u> Schneid.	138
4.3 Subzelluläre Kompartimentierung von STOX	139
4.3.1 Ultrastrukturelle Analyse von Zellen einer <u>Berberis wilsoniae</u> var. <u>sub-</u> <u>caulialata</u> Schneid. Suspensions- kultur	140
4.3.2 Isolation einer subzellulären Vesi- kelfraktion mit STOX-Aktivität	148
4.3.3 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Vesikel	159
4.3.4 In vitro Biotransformations- experimente	170

	Seite
5. Biotechnologische Aspekte der (S)-Tetra- hydroprotoberberin Oxidase (STOX)	174
5.1 Immobilisierung von STOX	177
5.1.1 Immobilisierung intakter Zellen....	177
5.1.2 Immobilisierung zellfreier STOX- Präparationen	180
5.2 Vergleichende Untersuchung von immobili- siertem und löslichem STOX	186
5.2.1 Stabilität	186
5.2.2 Temperatur-Optimum	189
5.2.3 pH-Optimum	189
5.2.4 Kinetische Parameter	191
5.2.5 Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln	192
5.3 Enzymatisch-chemische Überführung eines Norretikulin-Razemats in das (R)- Enantiomere.....	194
IV. DISKUSSION	201
V. ZUSAMMENFASSUNG	225
VI. LITERATURVERZEICHNIS	229

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3)-ethyl-benzothiazolinsulfat
BBE	Berberinbrückenenzym
Bq	Becquerel(1 Zerfall pro Sekunde)
CI	Chemische Ionisation
Ci	Curie ($3.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$; $2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfallsrate (desintegrations per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kat	Katal (Enzymmenge, welche 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kD	kilo Dalton
LS	Zellkulturmedium nach Linsmaier und Skoog
M ⁺	Molekularpeak
Min.	Minute
MSH	β-Mercaptoäthanol
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
POD	Peroxidase
s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-(L)-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
STOX	(S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase
Tricin	N-(tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
% w/v	Volumenprozent
% w/w	Gewichtsprozent
UB	Unspezifische Bindung

I. EINLEITUNG

"Bedenke wohl die erste Zeile,
daß deine Feder sich nicht übereile!"

denkt Dr. H. Faust, als er stockend und grübelnd in seine Sprache zu übertragen versucht, was gemäß Johannes 1.1 am Anfang aller Dinge gestanden hat (GOETHE, 1832). Der faustischen Antwort und Forderung wurde mit Sicherheit jener junge Zeitgenosse des Weimarer Dichterfürsten gerecht, welcher das lang gesuchte "principium somniferum" des Opiums endlich rein in Händen hielt (SERTÜRNER, 1806). Mit Recht konnte somit ein Naturstoffchemiker, nach dem Anfang seiner Wissenschaft gefragt, antworten: Am Anfang waren Isochinoline (BISSET, 1985).

Schier exponentiell ist die Zahl einigermaßen charakterisierter Alkaloide im Zuge der Entwicklung der organischen Chemie und ständig verbesserter Trenn- und Nachweismethoden bis in unsere Tage angeschwollen. Die Fähigkeit, Alkaloide zu bilden, scheint auf keine Organismengruppe beschränkt zu sein. Sie lassen sich in Mikroorganismen (LUCKNER, 1984) und Pilzen (CAMPBELL, 1983) nachweisen; sie finden sich im Tierreich, bei Fadenwürmern, Insekten (WHEELER et al., 1981) und Amphibien (DALY, 1982), bei Säugetieren (GOLDSTEIN, 1985), und, was nicht überrascht, auch beim Homo sapiens sapiens (COLLINS et al., 1979). Bei weitem am besten untersucht ist das Reich der Pflanzen, welches den Hauptanteil der über 7000 bekannten Alkaloide stellt (RAFFAUF, 1970; MOTHES, 1981). Bedenkt man, daß erst etwa 5 bis 10% der bekannten Pflanzenspezies grob auf Sekundärstoffe hin untersucht worden sind, und das oft mit verengter Sichtweise auf spezielle Wirkstoffe hin, kann man erahnen, welchen Reichtum die Natur dem Naturstoffchemiker noch bereithält (BALANDRIN et al., 1985).

In der Fülle unterschiedlichster Alkaloidklassen behaupten die strukturell so vielfältigen Isochinoline seit der stimulierenden Morphinentdeckung eine zentrale Stellung. Ihre bekanntesten Vertreter zeigen die unterschiedlichsten

Wirkungen: Die aus dem für heilig gehaltenen Peyote isolierten Kaktusalkaloide rufen Depersonalisierungserscheinungen und verschiedenste Halluzinationen hervor (FURST, 1982). Tubocurarin, ein Bisbenzylisochinolin, wird in der modernen Medizin als Muskelrelaxans verwendet, oder gilt - in traditioneller Verwendung, sorgfältig überdosiert - als tödliches Pfeilgift (BISSET, 1985). Die stark analgetische Wirkung des Morphinandienons Morphin ist gepaart mit seinen angstlösenden, euphorisierenden Effekten, welche das hohe Suchtpotential dieser Verbindung erklärt (FORTH et al., 1977). Wirtschaftlich bedeutender ist sein Monomethyläther Codein mit seiner dämpfenden Wirkung auf das Hustenzentrum; im übrigen derjenige pflanzliche Wirkstoff, welcher - abgesehen von den Steroiden - am häufigsten arzneilich eingesetzt wird (FARNSWORTH und MORRIS, 1976).

Während die beiden letztgenannten Alkaloide nur in vier Arten der Gattung Papaver in signifikanten Mengen nachweisbar sind (WIECZOREK, 1985), finden sich Alkaloide vom Typ der Bisbenzylisochinoline, welche mit weit über 200 Vertretern die größte Isochinolin-Untergruppe darstellen, in zehn verschiedenen Familien (SCHIFF, 1983). Vergleichbar verbreitet in den Familien der Berberidaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Annonaceae und vier weiteren Familien der Dicotyledonae sind die oft auffällig gelb und rot gefärbten Protoberberine, deren Zahl seit Entdeckung des namensgebenden Berberins vor 150 Jahren auf über 40 angewachsen ist.

Wenngleich Berberin in modernen Pharmakologiebüchern der westlichen Welt kaum Erwähnung findet, gehört es doch zu den weitest verbreiteten Arzneistoffen (DRAGENDORFF, 1967).

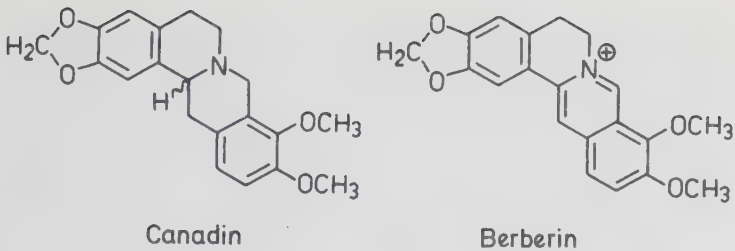


Abbildung 1 Struktur des Protoberberinalkaloids Berberin und des korrespondierenden Tetrahydroprotoberberinalkaloids Canadin.

Seine erregende Wirkung auf die glatte Muskulatur wurde vor allem im Hinblick auf die Uterusmotorik beschrieben (AUSTER und SCHÄFER, 1958; LINDNER, 1985). Während die quaternäre Base positiv inotrop wirkt (MAROKO et al., 1982) zeigt die entsprechende reduzierte Verbindung, das Canadin, als Methylchlorid blutdrucksenkende Wirkung (PATEL et al., 1970). Die für die quaternären Alkaloide beschriebene kompetitive Hemmung der Cholinesterasen könnte hierbei eine Rolle spielen (ULRICHOVÁ et al., 1983). Die Hauptverwendung findet Berberin allerdings wegen seiner entzündungshemmenden Wirkung und seiner Toxizität gegenüber Bakterien, Pilzen und Protozoen (AUSTER und SCHÄFER, 1958; HAHN und CIAK, 1975; MAHAJIAN et al., 1982). Zur Erklärung dieser Wirkungsweise könnten die Untersuchungen von HAHN und KREY (1971) dienen, welche eine Interkalation des 8,9-Dimethylacridin-ähnlichen Berberins mit DNA wahrscheinlich gemacht haben.

Zu den aus Pflanzen gewonnenen Naturstoffen gibt es in der Therapie oft keine Alternative. Zwar wurden für die meisten Naturstoffe chemische Synthesewege ausgearbeitet, doch beschränkt sich die kommerzielle Synthese auf etwa zehn Verbindungen (FARNSWORTH, 1984). So bleibt als einzige Quelle die Pflanze. Saisonale Unwägbarkeiten, Heterogenität der

oft in tropischen, politisch instabilen Ländern angebauten Arzneipflanzen und hohe Kosten führten seit den 50er Jahren zu Überlegungen und Versuchen, Zellkulturen von interessanten Arzneipflanzen anzulegen. Die Totipotenz der Einzelzelle war 1958 überzeugend durch die erfolgreiche Regeneration von Daucus carota-Pflanzen aus einzelnen Zellen belegt worden (STEWART et al., 1958). Es sollte somit kein prinzipielles Problem sein, die pflanzliche Sekundärstoffproduktion in Form pflanzlicher Zellkulturen zu etablieren. Vergleicht man nun eine Liste der 80 wichtigsten pflanzlichen Arzneistoffe (FARNSWORTH, 1984) mit einer Liste der Sekundärstoffe, welche in pflanzlichen Zellkulturen in signifikanten Mengen gebildet werden (ZENK und DEUS, 1982; BERLIN, 1984), so zeigt sich, daß einzig die Protoberberinalkaloide in beiden Aufstellungen aufgeführt werden. Dies schlägt sich auch in den zahlreichen Veröffentlichungen zur Produktion dieser Stoffklasse in Zellkultur nieder (HINZ und ZENK, 1981; NAKAGAWA et al., 1984; SATO und YAMADA, 1984; BREULING et al., 1985). Was erklärt die Gründe, daß sich bislang nur ein interessanter Arzneistoff in größeren Mengen mit pflanzlichen Zellkulturen produzieren läßt?

Ein zentrales Problem entdifferenzierter pflanzlicher Zellkulturzellen stellt die Kopplung der Sekundärstoffbiosynthese und der cytologisch morphologischen Differenzierung dar. Sehr schön zeigen läßt sich diese Korrelation für die Morphinalkaloide im Latex von Papaver (RUSH et al., 1985), für Tropanalkaloide in Datura-Wurzeln (HIROAKA und TABATA, 1974) und viele weitere Inhaltsstoffe (WIERMANN, 1981). Daß eine Entkopplung aber möglich ist, zeigen die erfolgreichen Beispiele (FUJITA et al., 1981; FUJITA und HARA, 1985; BERLIN, 1983; MISAWA, 1985). Allerdings prägen hier Zufall und Empirie die Entwicklung weit mehr als einsichtiges Handeln. Das zweite große Problem stellt die mikroskopische Inhomogenität der Naturstoffbiosynthese und -akkumulation in makroskopisch gleichförmig erscheinenden Zellkulturen dar. Zwar lassen sich Einzelzellen mit sehr hohen als auch sehr niedrigen Gehalten isolieren, doch

zeigen in den davon abgeleiteten Zelllinien keineswegs alle Zellen den gleichen hohen oder niedrigen Gehalt. Bis auf wenige Fälle regulieren die Zellen bei Wegfall der Selektion ihren Sekundärstoffgehalt auf ein niedriges Niveau (DEUS, 1980, DEUS-NEUMANN und ZENK, 1984 a). Diese Problematik ergibt sich hauptsächlich aus dem fehlenden inhärenten Selektionsdruck. Eine Einzelauslese von Hochleistungsklonen über Plattierungstechniken oder eine Einzelzellselektion über Zellsortierung, wie sie in der medizinischen Forschung seit Jahren durchgeführt wird, ist daher noch nicht die beste Lösung.

Die biotechnologischen Produktionsunwägbarkeiten von Alkaloiden wären möglicherweise beseitigt, wüßte man nur den Schalter, welcher die Biosynthesekette zum Laufen bringt. Produktionssteigerungen durch Medienvariation, durch Streß oder die Applikation von Elicitoren lassen sich nämlich in dieser Denkrichtung noch zu keinem vereinheitlichten Modell zusammenbauen (PELOSI et al., 1985; FRISCHKNECHT und BAUMANN, 1985; EILERT et al., 1985; SCHUMACHER, pers. Mitteilung). Die Lösung scheint einfach in der Klonierung pflanzlicher Biosynthesewege zu liegen (IBELGAUFTS, 1983).

Nun sind die Alkaloide aber niedermolekulare Heterozyklen und könnten als solche eher als sekundäre Translationsprodukte bezeichnet werden. Klonieren lassen sich selbstverständlich nur Nukleotidsequenzen, welche für die gewünschten Biokatalysatoren kodieren. Während die einzelnen Biosyntheseschritte vieler medizinisch wertvoller Alkaloide geklärt scheinen (CORDELL, 1981), ist die Enzymatik fast aller pharmazeutisch interessanten Alkaloidklassen noch ein weitgehend unbearbeitetes Gebiet im pflanzlichen Metabolismus.

Durch in vivo Fütterungsexperimente mit Isotopen-markierten Vorstufen konnten in den letzten 30 Jahren beträchtliche Einblicke in die Biosynthese zahlreicher Sekundärstoffe ge-

wonnen werden. Doch nur eine sehr kritische Analyse der Intermediate und Produkte kann vor oft naheliegenden Fehlschlüssen schützen, wie das Beispiel des Plumbagins zeigte (DURAND und ZENK, 1974). Wirkliches Verständnis der biosynthetischen Wege führt nicht über die Betrachtung der Pflanzenzelle als "Black Box", sondern über das Kennenlernen derjenigen Enzyme, welche diese oft so komplizierten organischen Moleküle aufbauen. Enzymatik also als conditio sine qua non! Enzymatisches Arbeiten in diesem Sinne bedeutet also, nicht zellfrei mit Rohextrakten zu hantieren, sondern mit angereinigten, im Idealfall homogenen Enzymen zu experimentieren.

Unter diesem Gesichtspunkt macht die pflanzliche Alkaloidchemie mit ihren Tausenden von Verbindungen einen recht bedürftigen Eindruck.

Mit am besten untersucht sind in dieser Hinsicht die Indolalkaloide. Das erste Enzym, welches die Kondensation des Tryptamins mit dem Glucosid Secologanin zum 3 α -(S)-Strictosidin, dem universellen Vorläufer der monoterpenoiden Indolalkaloide katalysiert, ist wohl eines der bestuntersuchten Sekundärstoffenzyme. Nach seiner Entdeckung (TREIMER und ZENK, 1979) wurde es nicht nur zur Homogenität gereinigt, immunologisch charakterisiert und immobilisiert (PFITZNER, U., 1984), sondern auch bereits ansequenziert (HAMPP, pers. Mitteilung). Strictosidin-spezifische Glucosidasen, welche das Aglykon freisetzen, wurden von HEMSCHEIDT und ZENK 1980 gereinigt. Schließlich konnten 1985 die gleichen Autoren eine Reduktase charakterisieren, welche die NADPH-abhängige Reduktion von Iminium-Cathenamin zum Heteroyohimbin-Tetrahydroalstonin katalysiert. Das Substrat dieser Reaktion leitet sich vom 4.21-Dehydrogeissoschizin ab, welches von einer ebenfalls gereinigten Dehydrogenase aus Geissoschizin gebildet wird (PFITZNER und STÖCKIGT, 1982). Der nach Schluß der C(5) - C(16) Bindung im Geissoschizin gebildete Polyneuridinaldehyd wird in seinem monoterpenoiden Teil von einer ungewöhnlich spezifischen Esterase gespalten, deren

Produkt an der biosynthetischen Aufgabelung zu den Alkaloiden des Ajmalin- und des Sarpagintyps steht. Von den zur enzymatischen Sarpaginbildung benötigten zwei Enzymen ist der hydroxylierende Schritt auf enzymatischem Niveau noch nicht geklärt (PFITZNER und STÖCKIGT, 1983 a,b). Die Acetyl-CoA-abhängige Vinorinsynthase am Beginn des Ajmalanwegs konnte charakterisiert werden (PFITZNER, 1984), doch hat man die Enzyme, welche Vinorin zu Vomilenin umsetzen, und die nachfolgende Reduktase noch nicht in Händen. Untersucht sind allerdings die Acetylesterase und N-Methyltransferase, welche schließlich zum Ajmalin führen (POLZ, FAHN, pers. Mitteilungen). Eine Raucaffricin-Glucosidase, welche zum Vomilenin führt, wurde isoliert (SCHÜBEL et al., 1985). In der riesigen Indolalkaloidgruppe ist ansonsten lediglich bei den Verbindungen vom Aspidospermatyp eine terminale Acetyltransferase auf enzymatischem Niveau untersucht (FAHN et al., 1985). Bei den noch komplizierteren dimeren Formen gibt es keine Arbeiten mit gereinigten Enzymen, wengleich Substanzen wie Vinblastin ganz oben auf der Sekundärstoffwunschlische stehen (KUTNEY, 1984). Weit oben stehen auch die Tropanalkaloide, wie Atropin oder Scopolamin. Lediglich die stereospezifische Tropindehydrogenase, das letzte Enzym der Tropinbiosynthese, konnte etwas angereichert werden (KOELEN und GROSS, 1982). Angereichert werden konnten auch die Putrescin N-Methyltransferase und Oxidase, welche frühe Schritte in der Biosynthese der Tropanalkaloide wie auch des Nicotinpyrrolidinrings katalysieren (MIZUSAKI et al., 1971, 1972). Mehrere Oxidasen, welche am Umbau der Nicotinsäure zum Ricinin beteiligt sind, wurden aus Rhizinus communis isoliert (FU et al., 1972). Mit relativ sauberen Enzympräparationen konnte M. ROBERTS 1977 über die enzymatische Bildung des Piperidins γ -Conicein berichten. Ihre sonstigen Arbeiten über die Schierlingsalkaloide erfolgten auf Rohextrakt-Niveau (ROBERTS, 1975). Ebenfalls auf dieser Stufe sind die gegenwärtigen Arbeiten zur Biosynthese der Acridonalkaloide (BAUMERT et al., 1983). Auch aus dem Biosyntheseweg der Kaffee- und Schokoladealkaloide, den Purinen Coffein und

Theobromin, wurde von zellfreien Systemen mit Methyltransferaseaktivität berichtet (WALLER et al., 1983). Die Biosynthese dieser Inhaltsstoffe ist allerdings hauptsächlich von akademischem Interesse, da für diese Substanzen industriell rein chemische Synthesewege beschrieben werden. Während die lichtabhängige Quinolizidinbiosynthese in Chloroplasten - wie so viele andere Wege auch - recht gut durch modernste Tracerexperimente belegt ist (SPENSER, 1985), konnte auch hier noch keines der Enzyme, welches sich in zellfreien Extrakten nachweisen ließ, wie z.B. der Cadaverin-Pyruvat-Transaminase oder der 17-Oxosparteinsynthase, weiter gereinigt und charakterisiert werden (WINK et al., 1979; WINK und HARTMANN, 1979; MURAKOSHI et al., 1977).

Dieser kurze Abriß, welcher sich ohnehin nur derjenigen pflanzlicher Alkaloidtypen annahm, über welche enzymatische Arbeiten vorliegen, zeigt, welche immense Lücke es in der Enzymatik der pflanzlichen Alkaloidbiosynthese zu schließen gilt. Doch betrachten wir zum Abschluß die Biosynthese der Isochinolinalkaloide, schwerpunktmäßig der Protoberberine.

Wie schon in den zahlreichen oben angeführten Beispielen, sind im Falle der einfachen Isochinolinalkaloide ebenfalls lediglich einige Methyltransferasen angereinigt worden (BASMADJIAN et al., 1978). Wesentlich besser allerdings ist das Bild, welches wir von der Enzymatik der Benzylisochinoline haben. Es soll hier nicht versucht werden, noch einmal einen vollständigen historischen Abriß all der Experimente zu geben, welche zu unserer heutigen Vorstellung von der Bildung der Isochinolinalkaloide beitrugen (zusammengefaßt in: SHAMMA, 1972; STAUNTON, 1979; CORDELL, 1981). Lediglich in ihren Kerninhalten möchte ich die präenzymatische Entwicklung kurz darstellen, um dann die bekannten Enzyme in der Benzylisochinolinbiosynthese zu besprechen.

Vermutungen zur Biogenese der Isochinolinalkaloide wurden bereits 1910 (WINTERSTEIN und TRIER) angestellt, wonach der Skelettyp über die Kondensation eines Aldehyds mit einer

Aminofunktion im Sinne einer Pictet-Spengler Zyklisierung gebildet werden sollte. Modifiziert wurde dieser Vorschlag von HAHN und STIEL 1936, welche α -Ketosäuren an die Stelle des Aldehyds setzten. Übereinstimmung herrschte darüber, daß sich die Isochinolinalkaloide von den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ableiteten.

Experimentelle Überprüfung der Hypothesen wurde erst mit der Verfügbarkeit geeigneter Isotopen-markierter Vorstufen möglich. Die Aminosäurehypothese konnte bestätigt werden (KLEINSCHMIDT und MOTHES, 1959) und die postulierte Bildung von Norlaudanosolin als erstem Benzylisochinolinintermediat wurde nachgewiesen (BATTERSBY, 1964). Das dreifach methylierte Derivat, das Retikulin, wurde schon bald als biogenetische Schlüsselverbindung erkannt, da seine Inkorporation in zahlreiche, strukturell verschiedene Skelettypen - wie der Morphine und Tetrahydroprotoberberine - gezeigt werden konnte. Die räumliche Konfiguration am chiralen C-Atom 1 ist dabei von entscheidender Bedeutung.

Stereochemische Probleme können im allgemeinen nur mit asymmetrischen Systemen gelöst werden, was Enzyme in hohem Maße für solche Fragestellungen prädestiniert. Doch ist auch hier der Stand - besser Rückstand - der Enzymatik der komplizierten Isochinolinalkaloide beträchtlich. Von den Benzylisochinolin-, Protoberberin- und Morphinalkaloiden abgesehen gibt es in den zahlreichen Isochinolinklassen keine enzymatischen Untersuchungen.

Die Enzymatik der Morphinandienone befindet sich ebenfalls in einem noch recht unausgereiften Stadium. So haben HODGES und RAPOPORT 1982 in Rohextrakten die Konversion von (R)-Retikulin zu Salutaridin beschrieben, was jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden konnte. Eine biotechnologisch uninteressante Reduktaseaktivität, welche Codeinon zu Codein reduziert, wurde ebenfalls nur in Rohextrakten gemessen (FURUYA, 1978). Schließlich konnte zellfrei die Morphintransformation zu einer Pseudoform und

dem N-Oxid beobachtet werden (VAGUYVALFI und STIFTER-PETZ, 1982).

Star in der Alkaloidenzymatik jedoch sind die Benzylisochinoline, da hier erstmals eine lückenlose Biosynthesekette aufgeklärt werden konnte. Mit der Entdeckung (RÜFFER et al., 1981) und Reinigung der (S)-Norlaudanosolin-Synthase 1983 durch SCHUMACHER et al. konnte die Kontroverse um die Kondensationspartner endlich zugunsten der Aldehyd-Hypothese gelöst werden. Die Biosynthese der beiden Reaktionspartner, Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd vom Tyrosin ausgehend, erscheint klar, doch läßt sich die Hauptroute nicht mit Sicherheit angeben, da über Poolgrößen und mögliche Kompartimentierung keine präzisen Angaben vorliegen (siehe Abb. 2). Eine stereounspezifische Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase (RÜFFER et al., 1983) sowie eine für das (S)-Enantiomer spezifische 4'-O-Methyltransferase (FRENZEL, pers. Mitteilung) konnten näher charakterisiert werden. Der abschließende Methylgruppen-transfer von (S)-Adenosylmethionin durch eine stereounspezifische Methyltransferase mit einer breiten Substratspezifität für verschiedene Nor-Benzylisochinoline schließt die Retikulinbiosynthese ab (WAT et al., 1985) (siehe Abb. 5).

Ganz unterschiedliche enzymatische Oxidationen können mit dem (S)-Retikulin erfolgen und es in verschiedene Biosynthesewege schleusen (siehe Abb. 3). Erhalten bleibt die Benzylisochinolinstruktur bei der Oxidation zum 1,2-Dehydroretikulin, welches nach Reduktion zum (R)-Enantiomer die Ausgangsverbindung für die Morphinbiosynthese darstellt (BATTERSBY et al., 1965; BORKOWSKI et al., 1978). Auch bei der oxidativen Kopplung zweier Moleküle über Phenylätherbrücken zu Dimeren bleibt das Benzylisochinolinskelett erhalten. Alle restlichen Oxidationen erweitern das Molekül auf vier Ringe. Phenolkopplung des Benzylrests mit dem A-Ring führt zu den Proaporphinen, mit dem C-Atom 3 im B-Ring zum Pavinskelett. Ausbildung eines Aryläthers zwi-

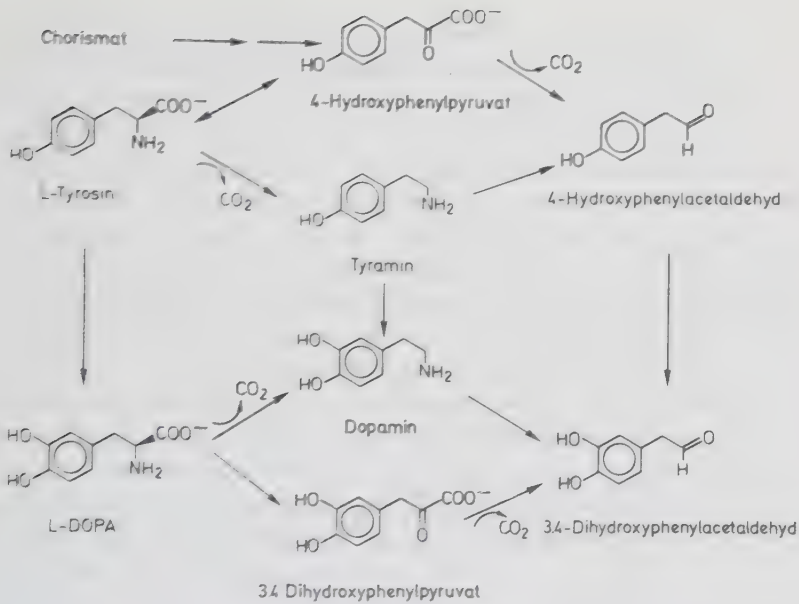


Abbildung 2 Mögliche Biosynthesewege vom Tyrosin zum Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (Abbildung nach ZENK et al., 1985).

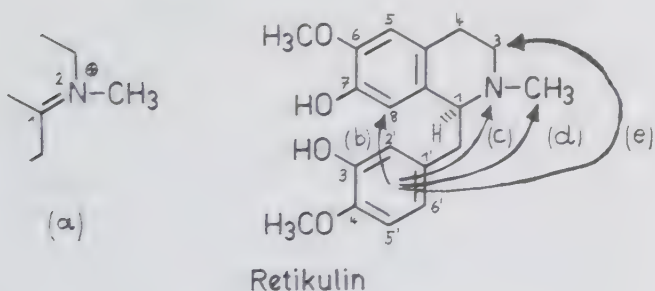


Abbildung 3 Oxidationsreaktionen am (S)-Retikulin. Ausbildung von 1,2-Dehydroretikulin (a) Zyklisierung des Benzylrests mit dem Isochinolingerüst zu Aporphinen, Cularinen (b), Benzopyrrocolinen (c), Tetrahydroprotoberberinen (d), Pavinen (e).

schen Benzylgruppe und A-Ring ergibt Verbindungen vom Cularintyp. Weitere Zyklisierungen können unter Ausbildung eines 5-Rings erfolgen, falls der Benzylrest direkt mit dem Isochinolinstickstoff verbunden wird, wie es bei den Dibenzopyrrocolinen der Fall ist. Schließlich ist ein oxidativer Ringschluß über die N-Methylfunktion zum (S)-Scoulerin möglich, einem Alkaloid vom Typ der Tetrahydroprotoberberine. Lediglich dieser letzte Schritt, die enzymatische Ausbildung der Berberinbrücke, wurde auf enzymatischem Niveau äußerst gründlich untersucht. Das Berberinbrückenenzym, welches unter stöchiometrischem Sauerstoffverbrauch streng stereospezifisch den (S)-Tetrahydroprotoberberinheterozyklus aufbaut, zeigt dabei eine enge Substratspezifität (STEFFENS, 1984). Das (S)-Scoulerin kann nun wie das (S)-Retikulin Skelett-erhaltend oder Skelett-verändernd oxidativ verändert werden (siehe Abb. 4). Eine

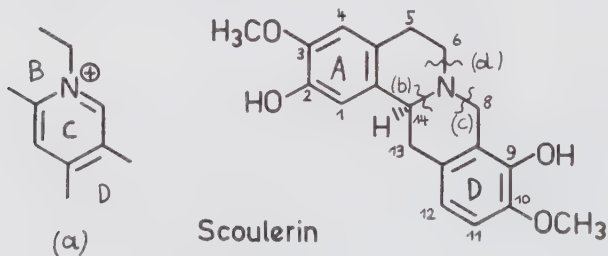


Abbildung 4 Transformationsreaktionen des (S)-Scoulerins. C-Ring Oxidation zum Protoberberin (a), C-N Spaltungen in der Biosynthese der Protopine (b), Phthalidisochinoline (c), Benzophenanthridine (d).

nur intermediäre Rolle spielt das Tetrahydroprotoberberinskelett bei den Isochinolinalkaloiden, in deren weiterem Biosyntheseweg eine der drei Bindungen gespalten wird. Alle drei Möglichkeiten sind in der Natur verwirklicht. N-C(8)-Spaltung führt zu Phthalidisochinolinen, N-C(14)-Spaltung zu Protopinen und in der Biosynthese der Benzo-phenanthridine wird die N-C(6)-Bindung gespalten. Konserviert wird das Tetrahydroprotoberberingerüst bei der Oxidation von Ring C zum entsprechenden Protoberberin, sowie natürlich bei allen Reaktionen, welche das Kernmolekül lediglich modifizieren, wie Methylierungen, Hydroxylierungen oder der Ausbildung von Methylenedioxybrücken. Keiner der erstgenannten Schritte ist auf enzymatischem Niveau untersucht. Lediglich zwei Enzymaktivitäten, welche das Skelett modifizieren, wurden gereinigt und charakterisiert. Das erste der beiden Enzyme methyliert stereo- und regiospezifisch den D-Ring von (S)-Scoulerin, während das andere am bereits im C-Ring oxidierten Molekül die Hydroxymethylfunktion mit der orthoständigen Hydroxylgruppe zu einer Methylenedioxygruppe verbindet (MÜMLER et al., 1985; RÜFFER und ZENK, 1985).

Aneinanderreihung aller charakterisierten Enzyme von der biogenetischen Fundamentalreaktion - Amin/Aldehyd-Kondensation - bis zur Ausbildung der Methylenedioxygruppe ergibt die fast lückenlose Biosynthese des Berberins. Einzig die Oxidation des Tetrahydroprotoberberingerüsts zum Protoberberin, der Übertritt des farblosen Skeletts in die bunte Welt der durchkonjugierten Protoberberine ist noch offen (siehe Abb. 5). Diese Lücke zu schließen war ein Ziel dieser Arbeit. Ein vollständiger, in jedem Einzelschritt enzymatisch verstandener Biosyntheseweg sollte ein gutes Modell sein, die biotechnologische Naturstoffproduktion zu ermöglichen.

Ein großes Problem für das Verständnis jeglicher Stoffwechselwege stellen die Parameter Ort und Zeit dar. Oft gewinnt man den Eindruck, die meisten cytoplasmatischen Stoffwechselwege liefen gleichzeitig in einer homogenen

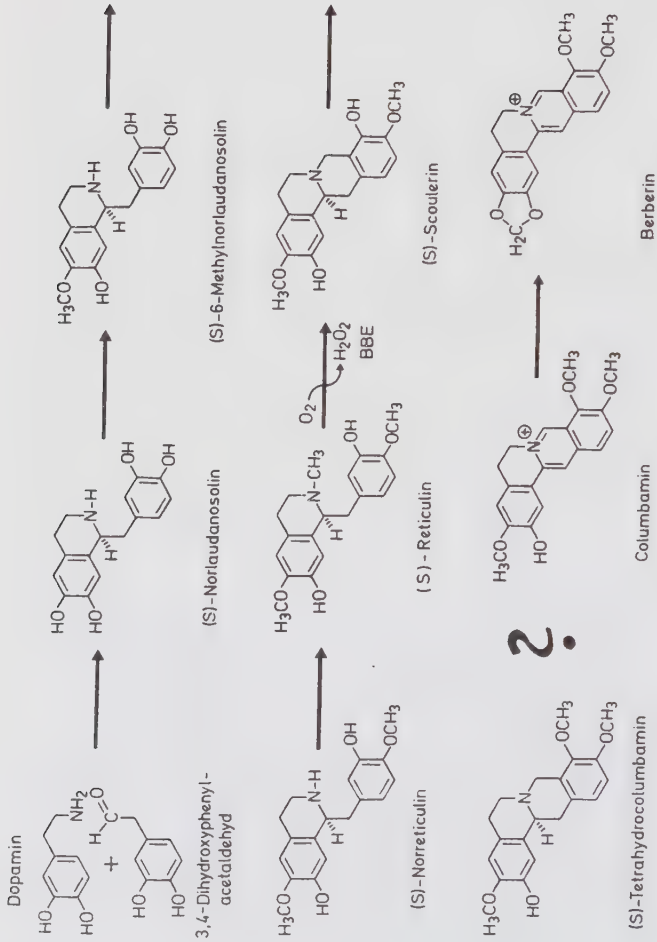


Abbildung 5 Biosynthese des Berberins.
 Alle angegebenen Reaktionen sind auf enzymatischem Niveau untersucht. Die Oxidation des Tetrahydroprotoberberinskeletts zum Protoberberin ist Gegenstand dieser Arbeit.

Phase ab. Unter diesem Aspekt ergibt sich für die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide aus dem oben dargestellten ein recht verwirrendes Bild. Da steht die enge Verzahnung des (S)-Adenosylmethionin- und Tyrosinpools des Primär- und des Sekundärstoffwechsels. Dazu kommt die Aufspaltung der Biosynthesewege auf der Stufe des Retikulins und der Tetrahydroprotoberberine. Die Isolation verschiedenster Alkaloidtypen aus pflanzlichen Zellkulturzellen zeigt, daß tatsächlich in vivo zahlreiche Biosynthesewege mit zum Teil gemeinsamen Intermediaten nebeneinander ablaufen (TANAHASHI und ZENK, 1985). Wie die Pflanzenzelle dieses Problem löst, ist bislang nicht verstanden. Die vorliegende Arbeit könnte auch dazu einen Beitrag liefern.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Biologisches Material

1.1 Pflanzliches Material

Die pflanzlichen Zellkulturen wurden aus der Zellkultursammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München zur Verfügung gestellt. Zur Kultivierung wurde das Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) (LS) mit 10^{-6} mol/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 10^{-6} mol/l 1-Naphthyllessigsäure, pH 6.0, verwendet. Für Kalluskulturen wurde das Medium mit 1% Agar (Merck, Darmstadt) verfestigt. Als Kulturgefäße für Kalluskulturen dienten Petrischalen (6 cm Ø). Suspensionskulturen wurden entweder in Erlenmeyerkolben (300 ml Volumen mit 75 ml Medium bzw. 1 l mit 250 ml Medium) oder in 1.5 l Fernbachkolben (mit 1 l Medium) bei 23°C im Dauerlicht (650 lux) mit 100 Upm auf Rotationschüttlern angezogen. Die Subkultivierung erfolgte in 7 - 14-tägigem Rhythmus. Das Zellmaterial wurde durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt, entweder direkt verwendet, oder mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Die untersuchten differenzierten Pflanzen waren aus Samen verschiedener botanischer Gärten angezogen worden. Sie wurden in Frühbeeten oder Gewächshäusern des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München kultiviert. Für die Anzucht der Pflanzen möchte ich Herrn A. Nagy und Herrn F. Meyer herzlich danken. Die Untersuchung von Herbarmaterial wurde von Prof. Grau ermöglicht, der dankenswerterweise die Entnahme einiger Blattfragmente aus dem Staatsherbar München gestattete.

1.2 Versuchstiere

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren wurden Kaninchen verwendet, welche zu Beginn der Immunisierung acht Wochen alt waren. Die Produktion von Aszitesflüssigkeit zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurde mit Mäusen vom Stamm Balb/c durchgeführt.

1.3 Bakterien

Für den mikrobiologischen Flavinnachweis wurde Lactobacillus casei (ATCC 7469) verwendet. Der Stamm wurde dankenswerterweise von Prof. Bacher (Technische Universität, München-Garching) zur Verfügung gestellt.

2. Chemikalien

Thioglykolsäure, Morin, Acetylaceton, p-Hydroxymercuribenzoessäure und Dicumarol stammten von Sigma (München), Jodacetamid, Jodosobenzoessäure, N-Äthylmaleinimid und 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoessäure) von Serva (Heidelberg), o-Phenanthrolin von Merck (Darmstadt).

Von Pharmacia (Freiburg) wurden DEAE-Sephacel, Sephadex G 25, Sephacryl S-1000 sowie die aktivierten Sepharosen (BrCN, Epoxy, AH, Tresyl) bezogen, ebenso wie die Eichproteine für die Molekulargewichts-Bestimmung über Gelfiltration. Ultrogel AcA 44 wurde von LKB (Bromma, Schweden) geliefert, Matrex Blue A von Amicon (Witten/Ruhr). Controlled pore glass (CPG-10), Florisil und XAD stammten von Serva (Heidelberg), Eupergit C von Röhm Pharma (Weierstadt).

Folgende, für die Elektronenmikroskopie verwendeten Chemikalien wurden von Science Service (München) geliefert: Uranylmagnesiumacetat, Bleicitrat, Phosphorwolframsäure, Osmiumtetroxyd und Spurr's Lösungen.

Tris und Tricine stammten von Sigma (München), HEPES von Serva (Heidelberg), Natriumcacodylat von Merck (Darmstadt). Weiterhin von Sigma (München) waren 4-Aminoantipyrin, 3,3'-Diaminobenzidin γ -Aminopropyltriethoxysilan und Inosindiphosphat von der Firma Sigma erhältlich. S-Adenosylmethionin, Pyridinnucleotide, Riboflavin, FMN, FAD sowie Eichproteine für die Elektrophorese lieferte Boehringer (Mannheim). Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, SDS und Ammoniumpersulfat wurden von Serva (Heidelberg) bezogen. 6,9-Diamino-2-ethoxy-acridinlactat (Rivanol) wie auch 2,2'-Azino-di-(3)-ethyl-benzothiazolinosulfat (ABTS) stammte von Sigma (München).

Ferritin-konjugiertes Antikaninchen IgG lieferte Paesel (Frankfurt). Von Boehringer (Mannheim) wurden Meerrettichperoxidase, Katalase, Cytochrom C sowie Albumin bezogen.

NaBD₄ (98% D) war von Roth (Karlsruhe), d₄-Methanol von Merck (Darmstadt) erhältlich.

Die verwendeten Radiochemikalien NaB³H₄ und [¹⁴C]-Riboflavin stammten von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig). (R)- und (S)-[N-¹⁴C]-Retikulin und [¹⁴C]-S-Adenosylmethionin wurden mir freundlicherweise von Dr. Steffens bzw. von T. Frenzel, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, zur Verfügung gestellt. [1-³H]-(R,S)-Retikulin war bereits früher (AMANN, 1982) synthetisiert worden.

Die Referenzalkaloide - soweit sie nicht von Frau Dr. Rüffer und Dr. Tanahashi, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, überlassen wurden - stammten von Prof. N. Nagakura (Kobe, Japan), von Prof. B. Cassels (Paris, Frankreich), Dr. K.C. Rice und Prof. A. Brossi (Bethesda, USA) sowie von Prof. J. Slavík (Brno, CSSR).

Alle übrigen Chemikalien wurden von den üblichen Quellen bezogen und waren von größtmöglicher Reinheit.

3. Geräte

UV-Spektren und optische Tests wurden mit einem Spektralphotometer DMR 11 der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen, Fluoreszenzspektren mit einem Perkin-Elmer Fluoreszenz-Spektrometer 3000. Optische Drehwerte wurden mit einem Polari-meter Typ 241 (Perkin-Elmer, Überlingen) gemessen. Ein Finnigan MAT 44 S Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) oder chemischer Ionisation (CI, 180 eV) wurde zur Aufnahme von Massenspektren eingesetzt. ^1H -NMR-Spektren wurden bei 200 MHz mit einem Bruker WP 200 registriert.

pH-Wert und Leitfähigkeitsmessungen wurden am Digitalmeter Digi 610 von WTW (Weilheim) durchgeführt, ein Abbé Refraktometer (Zeiss) diente zur Messung des Saccharosegehalts von Lösungen.

Zentrifugationen wurden gekühlt in einer Sorvall Zentrifuge RC 58 (Rotoren: SS34, GSA) durchgeführt; für Ultrazentrifugationen stand eine Beckman L 2 mit einem Spinco SW 25.2-Rotor zur Verfügung.

Ultrafiltrationen wurden mit einer Amicon Rührzelle erzielt. Für Enzym-Reinigungen wurde das Chromatographiesystem der Firma LKB eingesetzt, bestehend aus einem Fraktionssammler Ultrorac 7000, einem UV-Detektor Uvicord III, einer Vario-perpex 12000-Pumpe und einem Gradientenformer Ultrograd 11300. Gelpermeations-Chromatographie wurde ebenfalls mit einem LKB-System durchgeführt. Als Säule wurde eine TSK G 3000 SW (21.5 x 600 mm) verwendet, die Instrumentierung bestand aus einer HPLC-Pumpe LKB 2150, einem Uvicord SD LKB 2158, einem LKB 2210-Schreiber und einem Fraktionskollektor der Firma Gilson, Modell 201. Für elektrophoretische Verfahren standen die LKB-Netzgeräte 2002 und 2197 zur Verfügung.

Die planimetrische Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde mit einem Gerät der Firma Kontron, MOP AM 02, durchgeführt.

4. Synthesen

4.1 Synthese von (R)- und (S)-Tetrahydroprotoberberinen

Zur Überprüfung der Substratspezifität von STOX wurden mehrere Tetrahydroprotoberberine in optisch reiner Form nach dem von BATTERSBY et al. (1966) für Scoulerin und Coreximin angegebenen Verfahren synthetisiert. Ausgangsverbindungen waren (S)-Norretikulin sowie die beiden Norprotosinomenin-Enantiomere, welche in einer Mannichreaktion mit Formaldehyd kondensiert wurden.

Es wurden 66 mg (S)-Norprotosinomeninhydrochlorid (188 μmol) in 5 ml Methanol gelöst und der pH nach Zugabe von 15 ml H_2O mit 0.5% NaHCO_3 auf einen Wert von 6.3 eingestellt. Nach Zugabe von 4 ml 35%igem Formaldehyd (38 mmol) wurde der Ansatz mit 5% NaHCO_3 wieder auf seinen ursprünglichen pH-Wert eingestellt und 24 h im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Aus dem trüben, gelblichen Ansatz wurde das Methanol am Rotationsverdampfer evaporiert, 30 ml H_2O zugegeben und der Ansatz bei pH 8.4 (eingestellt mit 5% NaHCO_3) mit CHCl_3 extrahiert. Die Lösung wurde auf 1 ml eingengt und auf eine Al_2O_3 -Säule (Merck, Darmstadt, neutral, Aktivierungsstufe III; 0.79 $\text{cm}^2 \times 15 \text{ cm}$) aufgegeben. Die Elution erfolgte zuerst mit CHCl_3 (ohne Methyl-2-buten!), bis keine Extinktion bei 280 nm im Eluat mehr gemessen werden konnte, dann mit $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (90/5). Eluat 1 lieferte das zyklisierte (S)-Norprotosinomenin-Äquivalent, Eluat 2 das zugehörige Isomer (S)-Coramin. Die Gesamtausbeute betrug 55%, wobei 16% auf (S)-Coramin entfielen. Das Produkt 1 war Dünnschicht-chromatographisch homogen (Laufmittel 1, Rf-Wert 0.7; vgl. II. 14). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 283 nm; MS m/z (rel. Int.%) 327 (M^+ 83), 326 (100), 178 (49), 176 (21), 150 (26), 135 (16).

Das Produkt 2, (S)-Coramin, lief im gleichen Fließmittelsystem bei einem Rf-Wert von 0.3. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 284 nm. Den vorangegangenen Ausführungen genau entsprechend wurde eine Synthese - ausgehend von (R)-Norprotosinomenin (45 mg) - mit 69% Gesamtausbeute durchgeführt, wobei 29% auf (R)-Coramin entfielen. Desweiteren wurde mit dem beschriebenen

Verfahren auch das (S)-Enantiomer des Norretikulins zu (S)-Scoulerin bzw. (S)-Coreximin umgesetzt. Die Gesamtausbeute betrug 58% bei einem Scoulerin-/Coreximin-Verhältnis von 53/47.

Da häufig quaternäre Protoberberine verfügbar waren, konnte man nun die entsprechenden Tetrahydroprotoberberine auch durch einfache Reduktion mit NaBH_4 in einem protischen Lösungsmittel erhalten (MIRZA, 1957). Exemplarisch diene die Synthese von (R,S)-Canadin aus Berberin: 2 g Berberin (Hydrochlorid, Sigma, München) wurden in 100 ml Äthanol gelöst und zu 70 ml heißem Methanol zugegeben. Nach Zugabe von 0.5 g NaBH_4 fielen Kristalle aus, welche nach 18 h abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wurden. Die Mutterlauge wurde eingeeengt und der Rückstand in Eiswasser eingerührt. Viermaliges Umkristallisieren des Niederschlags in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ lieferte ein weißes Produkt, das mit Canadin identisch war; Ausbeute 78%, UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 284 nm (Literatur: 284 nm; SHAMMA, 1972), MS e/z (rel. Int. %) 339 (M^+ 68), 174 (24), 164 (100), 149 (72).

4.2 Synthese von 13,14-Dehydro-Berberin

Reduziert man quaternäre Protoberberine unter wasserfreien Bedingungen, stoppt die Reduktion auf der Dihydrostufe (ELLIOT, 1969). Es wurden 5 g Berberin (Hydrochlorid, getrocknet) zu 30 ml frisch destilliertem Pyridin gegeben, welches 0.6 g NaBH_4 enthielt und 20 Min. bei 25°C gerührt. Nach Zugabe weiterer 0.5 g NaBH_4 wurde die braune Lösung 30 Min. später in 800 ml Eiswasser eingerührt. Der fahlgelbe Niederschlag wurde abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet. Nach Umkristallisieren in Benzol/Petroläther erhielt man 3 g orangebraune Kristalle. Schmelzpunkt 155 - 160°C (Literatur: 157 - 158°C, ELLIOT, 1967), Dünnschicht-Chromatographie: Rf-Wert 0.9 bzw. 0.3 in Laufmittel 2 bzw. 4 (vgl. II. 14). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 370, 283 nm. In Methanol konnte das Produkt mit NaBH_4 zu Canadin reduziert werden.

4.3 Oxidation von Tetrahydroprotoberberinen zu Protoberberinen

Um authentische Referenzsubstanzen für oxidierte Enzym-Produkte zu erhalten, wurden Tetrahydroprotoberberine mit Jod zu ihren entsprechenden Protoberberinen oxidiert (HOLLAND, 1979). Eine äthanolische Lösung von (S)-Scoulerin wurde dabei 10 Min. mit J_2 erhitzt. Nach Zugabe einer 5%igen wässrigen Na_2SO_4 -Lösung (Farbumschlag von braunrot nach gelb) wurde mit $CHCl_3$ ein rotes Produkt extrahiert, das bei Dünnschicht-Chromatographie (vgl. II. 14) in Laufmittel 2 einen Rf-Wert von 0.03, in Laufmittel 3 einen Rf-Wert von 0.8 aufwies. Das rote Produkt konnte mit $NaBH_4$ zu Scoulerin reduziert werden.

4.4 Synthese von (8,14- 3H_2)-(R,S)-Scoulerin

Entsprechend der in Abschnitt II. 4.1 beschriebenen Reduktion von Protoberberinen wurde auch hier verfahren. 0.5 ml (0.8 nmol) einer äthanolischen Lösung oxidierten Scoulerins (vgl. II. 4.3) wurden 2 h unter Eiskühlung mit einer nicht bestimmaren Restmenge $NaB[^3H_4]$ (spez. Radioaktivität 518 GBq/mmol) inkubiert. Der Ansatz wurde dünn-schichtchromatographisch gereinigt (Laufmittel 5, vgl. II. 14) und die markierte Substanz, die einen dem Scoulerin entsprechenden Rf-Wert (0.7) aufwies, mit Methanol eluiert. Unter Berücksichtigung des Extinktions-Koeffizienten von Scoulerin ($\epsilon_{283} = 7.08 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$) wurde für das Produkt eine spezifische Radioaktivität von 12.2 GBq/mmol ermittelt.

5. Gewinnung zellfreier Rohextrakte

5.1 Aufschluß differenzierter Pflanzen

Die Pflanzenteile (auch Herbarmaterial) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert (Mörser und Pistill, ggf. mit einer Mühle). Ein Aliquot wurde für die Trockengewichtsbestimmungen abgezweigt und das übrige Pflanzenmaterial mit der doppelten Menge Phosphat-Puffer (50 mmol/l,

pH 7.4, 5 mmol/l MSH) bis zu einer homogenen Suspension gerührt. Nach Abpressen durch Mull wurde der Preßsaft 10 Min. bei 10 000 g klar zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu 70% Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt, abzentrifugiert (10 Min. bei 10 000 g) und der resuspendierte Proteinniederschlag an Sephadex G 25 von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Konnte keine Proteinfällung durchgeführt werden, wurden störende Komponenten durch Säulenchromatographie des Extrakts an XAD 2 abgetrennt. Bei Mikroaufschlüssen, wie sie für immunologische Nachweise z.T. durchgeführt werden, wurde der klar zentrifugierte Preßsaft direkt verwendet. Gewebeaufschlüsse für Kompartimentierungsstudien werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

5.2 Aufschluß pflanzlicher Zellkulturen

Tiefgefrorenes Zellmaterial (II. 1.1) wurde in kaltem Aufschlußpuffer (1 g/2 ml) bei Raumtemperatur bis zu einem homogenen Brei gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Zellmasse, Pufferart und -volumen variierten und werden im jeweiligen Ergebnisteil dargestellt. Zur Untersuchung der subzellulären Kompartimentierung von Enzym-Aktivitäten war es notwendig, die Membranstrukturen der Zelle weitestgehend zu erhalten. Dazu wurde das frisch abgenutzte Gewebe bzw. das mit einer Rasierklinge kleingeschnittene frische Pflanzenmaterial in einem eisgekühlten Mörser mit der 1.5-fachen Menge Tricinpuffer (0.15 mol/l Tricin, 0.5 mol/l Saccharose, 10 mmol/l KCl, 5 mmol/l Thioglykolsäure, 1 mmol/l $MgCl_2$, 1 mmol/l Na_2EDTA ; pH 7.5 mit NaOH) 15 Min. zerrieben (BREIDENBACH und BEEVERS, 1967). Der Brei wurde durch 8 (!) Lagen Mull filtriert und das Filtrat entweder direkt oder nach unterschiedlicher Vorzentrifugation auf unterschiedlichen Saccharose-Dichtegradienten weiter aufgetrennt. Als Gradientenpuffer diente dabei stets ein Tricinpuffer (50 mmol/l Tricin, 1 mmol/l Na_2EDTA ; pH 7.5). Die benötigten Zentrifugationsschritte und Dichtegradienten werden im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

6. Enzymtests

6.1 Berberin-Brücken-Enzym (BBE)

Die Aktivität dieses Enzyms wurde nach der von STEFFENS (1985) beschriebenen Methode bestimmt. Testansätze enthielten 25 μmol Glycin-/NaOH-Puffer pH 8.9, 255 pmol (S)-[N- C^3H_3]-Retikulin (180 Ci/mol) und 50 μl Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 250 μl . Nach 60 Min. Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze durch Zugabe von 0.3 ml wässriger Aktivkohlesuspension (4 g/100 ml) gestoppt, 1 Min. geschüttelt, abzentrifugiert (Eppendorf-System) und die Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Für die Berechnung von 100%igem Umsatz wurden 33% der eingesetzten Radioaktivität zugrunde gelegt, wie es dem Ausbau eines der drei im Substratmolekül enthaltenen Tritiumatome entspricht.

6.2 Leit-Enzyme subzellulärer Kompartimente

Katalase: Das bislang noch klassische Leitenzym für Microbodies wurde nach der Methode von AEBI (1983) bestimmt, wobei photometrisch die durch den H_2O_2 -Verbrauch bedingte Extinktionsabnahme bei 240 nm gemessen wird. Die Ansätze enthielten in 1200 μl Gesamtvolumen 120 μmol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 sowie 8.3 μmol H_2O_2 . Die Katalase-Aktivität wurde mit dem Extinktions-Koeffizienten von H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 39.0 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$) quantifiziert.

NADH-abhängige Cytochrom-c-Reduktase: Das Leitenzym für das endoplasmatische Retikulum wurde photometrisch bei 550 nm nach LORD (1983) bestimmt. Der Testansatz enthielt neben der Enzymlösung 200 nmol NADH, 10 μmol KCN, 20 nmol oxidiertes Cytochrom c und 60 μmol Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0 in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Enzym-Aktivität wurde mit einem Extinktions-Koeffizienten von $2.1 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mmol}$ berechnet.

Latente Inosindiphosphatase (IDPase): Dieses Markerenzym des Golgi-Apparates läßt sich erst messen, nachdem die

Proben 3 Tage bei 4°C inkubiert waren (RAY et al., 1969; GREEN, 1983). Zur Aktivitätsbestimmung wird das freigesetzte Phosphat gemessen. Die Ansätze enthielten in 0.7 ml Gesamtvolumen 1.5 µmol Natriuminosindiphosphat, 0.5 µmol $MgCl_2$ und 50 µmol Tris-Puffer pH 7.5. Nach einstündiger Inkubation wurden Aliquots von 0.1 ml entnommen und das freigesetzte Phosphat nach der Methode von TAUSSKY und SHORR (1953) als blauer Farbkomplex bei 785 nm bestimmt.

Fumarase: Die Enzym-Aktivität dieses mitochondrialen Enzyms wurde nach HILL und BRADSHAW (1969) über die Bildung der Fumarsäure aus Malat bestimmt. Die Reaktion läßt sich photometrisch bei 240 nm verfolgen. Die Berechnung der Enzym-Aktivität wurde mit dem für Fumarsäure angegeben Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{240} = 2.6 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$) durchgeführt.

7. Immunologische Methoden

7.1 Immunisierung von Kaninchen mit (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)

Für die Herstellung der STOX-Antigen-Lösung wurden 200 µl physiologische Kochsalzlösung (10 mmol/l K/Na-Phosphatpuffer, 150 mmol/l NaCl, pH 7.4), 300 µl komplettes Freund'sches Adjuvans (Difco) und 100 µl STOX aus Berberis wilsoniae var. subcaulialata (10 - 50 µg elektrophoretisch gereinigtes Protein) durch Ultraschall (Sonifier B-12/B-15; Branson, Heusenstamm) emulgiert.

Zur Immunisierung wurden den Kaninchen 4 mal je 0.6 ml Emulsion im Abstand von 1 Woche subcutan am Oberschenkel des Hinterlaufs injiziert. Eine Woche nach der letzten Vorimmunisierung und im folgenden alle 3 Wochen erhielten die Tiere Boosterinjektionen, wobei 1 ml der Antigen-Emulsion intramuskulär in den Oberschenkel gespritzt wurde. 7 und 14 Tage nach jeder Boosterinjektion wurde den Tieren durch Anritzen der Ohrvene 20 - 50 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in Plastik-Zentrifugenbechern aufgefangen und 2 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Der entstandene Blut-

kuchen wurde von der Gefäßwand abgelöst und die Röhrchen über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Durch anschließendes Abzentrifugieren (10 000 Upm, 10 Min., SS 34 Rotor, Dupont Instruments, USA) wurde das Antikörper-haltige Serum abgetrennt, welches bis zu seiner Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurde.

7.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen STOX aus Mäuseaszites

Bereits 1984 waren von D. WALLSCHLÄGER Hybridomazelllinien beschrieben worden, welche Antikörper gegen STOX bildeten. Die von ihr am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München begonnene Gewinnung dieser monoklonalen Antikörper wurde fortgesetzt. Dafür wurden Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 0.5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethyl-pentadecan, Sigma, München) vorbehandelt. Nach 10 - 14 Tagen wurden diesen Tieren 10^6 Hybridomazellen der verschiedenen Zelllinien intraperitoneal injiziert. Beginn der Bauch der Tiere infolge vermehrter Flüssigkeitsproduktion anzuschwellen, wurde den Tieren die Aszites-Flüssigkeit durch Anstechen (0.6 mm Nadel, 5 ml Spritze) der Bauchhöhle entnommen, wobei pro Maus 0.5-15 ml Aszites pro Abnahme gewonnen werden konnten. Die Aszites-Flüssigkeit wurde auf Antikörper gegen STOX analysiert und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

Die Gewinnung der Immunglobuline aus Aszites wie auch aus dem Rohserum von Kaninchen erfolgte durch die von HURN und CHANTLER (1980) beschriebene kombinierte Rivanol-/Ammoniumsulfat-Fällung. Dazu wurde das Serum mit NaOH auf pH 8.5 eingestellt und tropfenweise 0.4%ige wässrige Rivanol-Lösung zugegeben (3.5 ml/ml Serum). Nach dem Abzentrifugieren wurde der gelbe Überstand mit aktivierter Holzkohle (15 g/l) 10 Min. gerührt und die filtrierte und erneut zentrifugierte Lösung anschließend bis zu 50% Sättigung langsam mit Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Die Lösung wurde danach 12 h bei 4°C stengelassen. Das dabei ausgefallene Immunglobulin wurde in Tris-Puffer (pH 7.8 50 mmol/l)

aufgenommen, gegen H_2O 3 Tage dialysiert, gefriergetrocknet und bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

7.3 Radiale Immundiffusion

Das Doppeldiffusions-Verfahren (OUCHTERLONY, 1985) wurde in 2% Agarosegelen (Sigma, mittlere Elektroendosmose, Typ II) bei pH 8.6 (20 mmol/l Barbiturat-Puffer) durchgeführt. Typischerweise wurden dazu in 1.8 mm dicke Gele um einen zentralen Brunnen 6 Löcher in hexagonaler Anordnung gestanzt. Die Löcher konnten Probenvolumina von 5 - 15 μl aufnehmen. Die Diffusion erfolgte vor Austrocknung geschützt bei Raumtemperatur.

7.4 Immunelektrophorese

Das nach GRABAR und WILLIAMS (1953) durchgeführte Verfahren kombiniert die elektrophoretische Auftrennung mit der hohen Spezifität der Antigen-/Antikörper-Wechselwirkung. Für die Durchführung wurde die Flachbett-Elektrophoresekammer Multiphor 2117 (LKB) mit zugehörigen Glasplatten, Schablonen und Gelsubstanzen bzw. vergleichbare Eigenkonstruktionen verwendet. Auf entfettete Glasplatten wurde eine gleichmäßige, 1 mm dicke Schicht 2%iger Agarose (in 0.02 mol/l Diäthylbarbiturat-/Natriumacetat-Puffer pH 8.2) gegossen. In die erstarrte Matrix wurden entsprechend der Versuchsanordnung Löcher und Rillen gestanzt. Als Elektrodenpuffer wurde ebenfalls 0.02 mol/l Diäthylbarbiturat-/Natriumacetat-Puffer pH 8.2 verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Kühlung der Trägerplatte ($5 - 10^{\circ}C$) in 60 - 150 Min. bei 5 V/cm. Als Frontmarker diente Bromphenolblau (0.01% w/v in H_2O). Nach Beendigung der Auftrennung wurden die parallel zur Laufrichtung gestanzten Rillen ausgehoben, Immunglobulinlösung einpipetiert und bis zur Ausbildung der Präzipitate inkubiert. Zur Anfärbung der Präzipitate wurden die Gele zunächst gewaschen (0.9% NaCl, 2 x 24 h; H_2O 24 h), mit Coomassie-Blau gefärbt (12 h; 0.25% w/v Serva Blau R in Methanol/Eisessig/Wasser = 5/1/5) und schließlich entfärbt (Methanol/Eisessig/

Wasser = 5/1/5), bis die nun blau gefärbten Präzipitate deutlich aus dem farblosen Hintergrund hervortraten.

7.5 Immunelektronenmikroskopie

Vesikel, die durch Ultrazentrifugation pelletiert worden waren, wurden mit gereinigten und unterschiedlich verdünnten (physiol. Kochsalzlösung, vgl. II. 7.1), gereinigten Antikörpern aus Kaninchen, welche gegen STOX gerichtet waren, bei 25°C für 90 Min. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden verschiedene Verdünnungen eines Ferritin-konjugierten Anti-Kaninchen Ig G (H & L, Ziege; Paesel, Frankfurt) zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vesikel mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, ein Aliquot der Vesikel-Präparationen auf Kollodium-befilmte Kupfergrids (Science Service, München) aufgebracht, mit 1%iger Phosphorwolframsäure nachkontrastiert und die Präparate elektronenmikroskopisch ausgewertet.

7.6 Immunoblotting

Das Verfahren, wie es von BURNETTE (1981) sowie von GERSHONI und PALADE (1983) dargestellt wurde, wurde in zwei Teilschritten durchgeführt:

- Transfer des Proteins auf Nitrozellulose
- Nachweisreaktion der fixierten Proteine.

Der Proteintransfer erfolgte entweder elektrophoretisch oder durch direktes Aufgeben der Proteinlösung auf die Nitrozellulose.

Elektrophoretischer Transfer: Der Elektrotransfer war notwendig, wenn Proteine, welche über eine Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Flachgel (vgl. II. 15) aufgetrennt worden waren, analysiert werden sollten. Der Transfer erfolgte in einer Transblot Apparatur (Bio-Rad, München) bei pH 7.4 in dem von TOWBIN (1979) beschriebenen Methanol-haltigen Blottingpuffer (192 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris, 20% w/v Methanol). Dazu wurde das zu blottende Gel ausgemessen und

ein entsprechend großes Stück Nitrozellulose (Membranfilter BA 85, Schleicher und Schüll, Dassel) sowie zwei etwas größere Stücke Filterpapier (Whatman 3M) ausgeschnitten und im Blottingpuffer eingeweicht. Das zu blottende Gel wurde unmittelbar nach Abbruch der Elektrophorese unter Verwendung von Handschuhen luftblasenfrei auf den Nitrozellulosefilter gelegt und dieser auf eines der vorbereiteten Filterpapiere aufgebracht. Diese Einheit wurde mit dem 2. Filterpapier abgedeckt und sandwichartig zwischen zwei mit Blottingpuffer getränkte poröse Trägerschichten in die Gerätehalterung eingelegt. Nach Kontrolle der richtigen Polung (Nitrozellulose auf Anodenseite) wurden 60 V für 2 - 3 h an diesen "Blot-burger" angelegt. Der Transfer erfolgte dabei in der Regel quantitativ. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde das geblottete Gel mit Coomassie gefärbt (Färbe- und Entfärbelösungen wie in II. 7.4)

Weniger aufwendig als der elektrophoretische Transfer ist die direkte Applikation von Proben auf Nitrozellulose. Diese "Dot-blot"-Technik wurde mit dem SRC-96 Minifold (Schleicher und Schüll, Dassel) durchgeführt, einer Apparatur, welche das getrennte Aufpipettieren von 96 Proben erlaubt. Dazu wurden der Apparatefläche entsprechende Stücke Nitrozellulose und Filterpapier ausgeschnitten (siehe oben), in Tris-Puffer (10 mmol/l; pH 7.4) eingeweicht und so in die Apparatur eingelegt, daß die Nitrozelluloseschicht oben lag. In die Probenkammern wurden anschließend bis zu 300 µl Probelösung pipettiert (0 - 50 µg Protein) und die Flüssigkeit durch Anlegen eines Unterdrucks durch die Nitrozelluloseschicht gesaugt. Der Filter wurde entnommen, markiert, um die ursprüngliche Orientierung festzuhalten und folgendermaßen weiterbehandelt:

Die Visualisierung der geblotteten Proteine erfolgte spezifisch mit Antikörpern und Peroxydase- bzw. (^{125}J)-markiertem Protein A oder über eine generelle Proteinfärbung.

Zur allgemeinen Proteinfärbung wurde die frisch geblottete Nitrozellulose 10 Min. mit Amidoschwarzlösung angefärbt

(0.1% in 45% Methanol, 10% Eisessig). Als Entfärbelösung diente 90% Methanol mit 2% Eisessig. Da der Blot-Vorgang insgesamt etwa 3 h, das Färben und Entfärben ca. 0.5 h in Anspruch nimmt, ist das beschriebene Blotting-Verfahren bei weitem schneller als die in Abschnitt II. 15.2 beschriebene Färbe- und Entfärbeprozedur von Acrylamidgelen.

Zur spezifischen immunologischen Identifizierung von Proteinen mußten zunächst die noch freien Bindungsstellen der Nitrozellulose mit Albumin (Fraktion V; Boehringer, Mannheim) abgesättigt werden. Nach Inkubation mit geeignet verdünntem Antikörper (1 : 2000) wurden die unspezifisch gebundenen Antikörper durch Waschen mit Puffer (enthält Triton X 100, Serva, Heidelberg)-abgewaschen. Der Membranfilter wurde anschließend mit einer Lösung von Staphylococcus aureus Protein A, das spezifisch bestimmte Gruppen von Immunglobulinen erkennt, inkubiert und nochmals gewaschen. Anschließend wurde bei Verwendung von Peroxydase-(POD)-markiertem Protein A mit einem geeigneten Substrat (s.u.) inkubiert. Bei Zugabe von radioaktiv markiertem Protein A erfolgte eine autoradiographische Auswertung. Für das nachstehend ausgeführte Protokoll wurden folgende Lösungen und Verbindungen benötigt: Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) : 10 mmol/l Tris, 0.9% NaCl, pH 7.6; (¹²⁵J)-Protein A (7 µCi/µg; New England Nuclear, Dreieich), Protein A Peroxydase (Sigma, München) und jeweils frisch bereitete Substratlösung zum Peroxydase-Nachweis: 25 mg 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma, München) in 50 ml TBS mit 18 µl H₂O₂ (30%ige Lösung, Merck). Die angegebenen Schritte wurden alle bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken auf einem Rundschüttler durchgeführt.

<u>Lösung</u>	<u>Inkubationsdauer</u>
TBS, 0.5% Triton	10 Min.
TBS, 0.5% Triton, 3% Albumin	60 Min.
TBS, 0.5% Triton	2 x 15 Min.
TBS, 0.5% Triton, 3% Albumin	12 h
Antikörper, Serumverdünnung z.B. 1 : 2000	

<u>Lösung</u>	<u>Inkubations- dauer</u>
TBS, 0.5% Triton	3 x 15 Min.
TBS, 0.5% Triton, 3% Albumin	3 h
Protein A - 0.13 $\mu\text{Ci/ml}$ bei (^{125}J)	
oder - 0.1 $\mu\text{g Protein/ml}$ bei POD	
TBS, 0.5% Triton	5x 15 Min.

Danach wurde die Nitrozellulose zwischen Filterpapier (Whatman 3M) getrocknet, anschließend entweder durch nachfolgende Autoradiographie (II. 13) ausgewertet, oder aber mit Substrat inkubiert (10 - 50 Min.), was zu einem braunroten, unlöslichen Farbkomplex führte. Die Filter wurden - wie beschrieben - getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

7.7 Radioimmunologische Bestimmung der Norretikulin-Enantiomere

Jedes der beiden Enantiomere des Norretikulins konnte mittels der von WIECZOREK (1985) zur Bestimmung von (R)- und (S)-Retikulin entwickelten Radioimmuntests bestimmt werden. Ausgenutzt wurde dabei, daß die Antiseren für den (S)-Retikulin-Nachweis eine 5%ige Kreuzreaktion mit (S)-Norretikulin eingingen, während die Kreuzreaktion des (R)-Retikulins spezifischen Serums mit (R)-Norretikulin 35% betrug. Das (R)-spezifische Serum wies nur eine 0.4%ige Kreuzreaktion mit (S)-Norretikulin auf, das (S)-spezifische Serum reagierte überhaupt nicht mit dem (R)-Enantiomeren von Norretikulin. Durchgeführt wurden die Tests wie folgt:

Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 800 μl enthielten verdünntes Rinderserum (1 : 6, 100 μl), 500 μl Kaliumphosphat-gepufferte 0.15 mol/l-Lösung ((S)-Test pH 5.7, (R)-Test pH 7.4), 100 μl einer verdünnten Lösung von (R)- bzw. (S)- $[\text{N-}^3\text{H}_3\text{]-Retikulin}$ (5 000 - 10 000 cpm) und 50 μl der zu analysierenden Probe oder bekannter (R)- und (S)-Norretikulin-Lösungen (0.05 - 50 μg). Nach Zugabe von 100 μl

geeignet verdünntem Antiserum wurden nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur die Antigen-/Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 1 ml gelöstem Ammoniumsulfat präzipitiert ((R)-Test: 80% gesättigte Lösung, (S)-Test: 90.8%). Nach erneuter Inkubation (1 h, Raumtemperatur) wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 49% gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0.25 ml Wasser resuspendiert und mit 1 ml Szintillator (Minisolve 1, Zinsser) gemischt. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde im Szintillationszähler bestimmt und auf Lochstreifen kodiert (Teletype 43; Soeder, Langen). Unter Einbeziehung der Kontrollansätze (UB-, B_0 -Werte) wurde rechnerisch eine Standardkurve ermittelt und die daraus ermittelten Werte der analysierten Proben ausgedruckt (Hewlett Packard, Loveland, USA).

8. Mikroskopische Verfahren

Lichtmikroskopische Beobachtungen wurden an einem Zeiss Stereomikroskop III durchgeführt (Carl Zeiss, Oberkochen). Fluoreszenz-Mikroskopie wurde entweder an diesem Gerät mit einem Fluoreszenz-Auflichtkondensor III/RS oder mit einem Polyvar-Weitfeld-Photomikroskop der Firma Reichert (Wien, Österreich) - mit dem Erreger-Sperrfilter, Modul B 1 - durchgeführt. Mit letztgenanntem Mikroskop konnte im Durchlicht auch mit differentiellm Interferenzkontrast (DIK) nach Nomarski (NEUPERT, 1967) gearbeitet werden. Durch Kopplung mit einer Videokamera sowie mit einem Bildspeicher und Echtzeitprozessor konnte die Interferenz-Bildqualität über verschiedene Verarbeitungsschritte am digitalen oder analogen Bild optimiert werden (sog. Allen Video Enhanced Differential Interference Contrast - AVEC-DIC-Video-Mikroskopie; ALLEN et al., 1981). Als zentrale Bildverarbeitungseinheit diente ein Photonic Microscope Image Processor C 1966 von Hamamatsu. Herrn Dr. D. Weiss, Zoologisches Institut der Universität München, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner am Botanischen Institut der Uni-

versität München mit einem Siemens Elmiskop 101. Die Vorbereitung der zellulären und subzellulären Präparate, Vor- und Nachkontrastierung, Entwässerung und Einbettungs-Verfahren sind im Ergebnisteil ausgeführt.

9. Proteinbestimmung

Proteingehalte wurden nach dem von LOWRY (1951) angegebenen, später modifizierten (BENSADOUN und WEINSTEIN, 1976) Verfahren bestimmt. Relative Protein-Konzentrationen, wie sie etwa bei Säuleneluat zu ermitteln waren, wurden durch Messung der Aromatenabsorption bei 280 nm oder nach der colorimetrischen Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Die Ergebnisse der beiden Methoden waren vergleichbar (siehe auch WAHL, 1985). Durfte kein Protein durch den Meßvorgang verlorengehen, wurde der Gehalt spektral photometrisch nach der Warburg-Christian-Methode (260/280 nm; LAYNE, 1957) oder nach EHRESMANN (228.5/234.5 nm; 1973) analysiert.

10. Aminosäure-Analyse

Die Analyse von Proteinhydrolysaten erfolgte mit dem Liquidat III von Kontron (Eching) über eine Dowex A 6-Säule. Als Fließmittel diente das Dionex-Fertigpuffer-System von Pierce (Rotterdam, Niederlande). Vor und nach jedem Lauf wurde die Säule mit dem Hydrolysatstandard der Firma Kontron kalibriert. Tryptophan konnte in dem System nicht bestimmt werden.

11. Kinetische Messung der Sauerstoff-Konzentration

Die Menge gelösten Sauerstoffs in Testansätzen wurde mit einer Clark'schen Sauerstoffelektrode bestimmt, welche eine variable Volumen-Einstellung (0.5 - 3 ml) gestattete (Bachofer, Reutlingen). Die Eichung erfolgte bei Inkubationstemperatur (30°C) und normalem Luftdruck (z.B. 1020 mbar) mit O₂-gesättigtem bzw. durch Zugabe einiger mg Dithionit O₂-frei gemachtem Wasser. Die zeitliche Änderung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde von einem Kompensationsschreiber registriert. Unter Berücksichtigung der

Eichwerte wurden die Sauerstoff-Konzentrationen der Proben durch Vergleich mit Tabellen der bekannten Löslichkeitswerte des Sauerstoffs ermittelt.

12. Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wurde zunächst nach der Methode von GALLATI (1967) bestimmt, welche zur Ausbildung eines roten Farbkomplexes führt. Nachdem die STOX-Enzymprodukte z.T. die gleiche Farbe zeigten, war der Test in dieser Form für quantitative Messungen nicht geeignet. Einen Ausweg bot die Verwendung von ABTS (CHAN und COTTER, 1980), dessen meergrünes Oxidationsprodukt sich ohne Interferenz mit dem gefärbten STOX-Enzymprodukt bei 730 nm spektralphotometrisch quantifizieren ließ. Ein typischer Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 600 µl bei einem pH von 7.0 50 µg Meerrettich-Peroxidase (POD), 45 µmol Kaliumphosphat-Puffer, 450 µg ABTS und 100 µl Probenvolumen mit verschiedenen Mengen an H_2O_2 . Der lineare Meßbereich reichte von 1 - 25 nmol H_2O_2 . Problematisch dabei war die Instabilität des gebildeten Farbkomplexes, der sich relativ schnell entfärbte. Zurückgeführt werden konnte dieser Effekt auf die Anwesenheit jedwelcher reduzierender Agenzien sowie auf Alkaloide, wie Retikulin, Scoulerin oder Canadin, also Verbindungen, welche für STOX Substrate darstellen. Der Test war daher in dieser Form ungeeignet.

Eine Lösung des Problems, welches in beiden Fällen auf die Anwesenheit von Substraten bzw. Enzymprodukten im H_2O_2 -Testansatz zurückführbar war, war die Entwicklung einer Methode, die störende Alkaloide aus dem Ansatz quantitativ entfernte, ohne dabei den H_2O_2 -Gehalt zu verändern. Als geeignet erwies sich die Zugabe einer methanolischen XAD-Lösung (2 g XAD, Typ 2, 50 - 100 µm, in 10 ml 30%igem Methanol) zu den Reaktionsansätzen (3 Teile Ansatz/1 Teil XAD-Lösung). Die Suspension wurde 30 Sek. geschüttelt, 2 Min. abzentrifugiert (Eppendorf System) und die H_2O_2 -Menge im Überstand bestimmt. Dazu wurden 100 µl des Überstands zu einem Ansatz pipettiert, der 0.45 µmol 4-Amino-

antipyrin (Sigma), 11.3 μmol Phenol (Merck), 45 μmol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 und 50 μg POD (50 Units) in einem Gesamtvolumen von 600 μl enthielt. Gemessen wurde die Extinktion des roten Farbkomplexes bei 492 nm in einem linearen Testbereich von 5 - 100 nmol (ARTISS und ZAK, 1981).

Für Präzisionsmessungen war dieser Test oft noch zu unempfindlich. Hundertmal empfindlicher war der fluorimetrische H_2O_2 -Nachweis mit Homovanillinsäure, mit welchem problemlos ein linearer Meßbereich von 0.05 - 20 nmol erreicht werden konnte (SNYDER und HENDLEY, 1971). Dazu wurden 100 μl des XAD-geklärten Ansatzes (s.o.) in eine Lösung pipettiert, welche in einem Endvolumen von 600 μl neben 40 μmol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.8 und 50 μg POD noch 100 μg Homovanillinsäure (Sigma) enthielt. Die Messung der Fluoreszenz-Emission erfolgte bei 425 nm mit einer Anregungswellenlänge von 315 nm.

13. Radioaktivitäts-Bestimmungen

Die Radioaktivität von Lösungen wurde szintillations-spektroskopisch in einem Betaszint BF 5004 Szintillationszähler (Berthold, Wildbad) nach Zugabe von je 5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint; Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Für die Berechnung von Zählausbeuten wurden interne Standards zugrunde gelegt. Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschicht-Chromatogrammen oder getrockneten Acrylamid-Flachgelen wurde mit Berthold Dünnschicht-Scannern (LB 2722-2; TLC linear Analyzer) ermittelt. Die qualitative Radioaktivitäts-Verteilung auf Flachgelen oder Immunoblots wurde autoradiographisch bestimmt. Die Exposition der Gele und Membranfilter auf Röntgenfilm erfolgte bei Raumtemperatur oder, falls Verstärkerfolie (Curix MX 800, Agfa Gevaert) verwendet wurde, bei -70°C in 18 x 24 cm lichtdichten Kassetten. Nach 2 - 14 Tagen wurde der Kodak-Röntgenfilm (Industrex AX 18 x 24) entwickelt und fixiert (Entwickler und Fixierbad: Adefo Chemie, Nürnberg).

14. Chromatographische Methoden

Analytische Dünnschicht-chromatographische Auftrennungen erfolgten auf Kieselgel-DC-Folien Polygram Sil G/UV₂₅₄ der Firma Macherey und Nagel, Düren, oder auf Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ beschichteten Folien von Merck, Darmstadt (neutral, Typ E). Präparative Auftrennungen wurden auf selbstgestrichenen (Desaga Streichgerät) Platten (20 x 20 cm) bei 1.5 mm Schichtdicke mit Kieselgel GF₂₅₄ Typ 60 (Merck) durchgeführt.

Folgende Laufmittel fanden Verwendung:

Nr.	Laufmittelsystem		
1	Chloroform/Methanol/Ammoniak (25%)	90/9/1	Si
2	Xylol/Methyläthylketon/Methanol/ Diäthylamin	50/50/6/2	A
3	Chloroform/Methanol/Essigsäure/ Wasser	80/35/5/0.5	Si
4	Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure	45/45/10	A
5	Chloroform/Aceton/Diäthylamin	50/40/10	Si
6	Toluol/Essigester/Diäthylamin	70/20/10	Si
7	Chloroform/Methanol/Ammoniak (25%)	68/18/0.6	Si
8	Essigester/Methyläthylketon/ Ameisensäure/Wasser	50/30/10/10	Si
9	Toluol/Methanol/Eisessig	10/9/1	Si
10	H ₂ O (Isoamylalkohol gesättigt)	-	Si
11	n-Butanol/Eisessig/Wasser	40/10/50	Si

Si ≙ Kieselgel

A ≙ Aluminiumoxid

15. Elektrophoretische Trennverfahren

15.1 Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung in Acrylamidgelen wurden kommerziell erhältliche Gele (Servalyt Precotes 3 - 10; Serva, Heidelberg) verwendet. Die Durchführung erfolgte in einem Multiphor 2117 (LKB) unter Kühlung der Träger-

platte auf 4 - 10°C. Als Anodenflüssigkeit diente eine wässrige Lösung von 3.3 g Asparaginsäure und 3.7 g Glutaminsäure auf 1 l H₂O, als Kathodenflüssigkeit 4 g Arginin, 0.6 g Lysin und 120 g Äthylendiamin in 1 l H₂O. Pro Bahn wurden 5 - 15 µl Probe mit weniger als 1% Proteingehalt aufgetragen. Je nach Gelgröße wurde bei 2 - 4 Watt Endleistung mit einer Anfangsspannung von 200 V und einer Endspannung von 1500 V gearbeitet. Die Gele wurden in 20% Trichloressigsäure für 10 Min. fixiert und anschließend zur Färbung für ca. 5 Min. mit einer sauren Lösung von Serva Blau W (100 mg in 250 ml H₂O mit 5 ml Eisessig) behandelt. Als Entfärber diente die Lösung von 250 ml Wasser und 5 ml Essigsäure. Als Markerproteine wurde die Serva Protein-testmischung 9 verwendet. Die fertigen Gele wurden im Trockenschrank bei 70°C getrocknet.

Die Präparation subzellulärer Strukturen wurde auf verschiedenen Wegen versucht. Als eine Möglichkeit erwies sich die trägerfreie isoelektrische Fokussierung in einem stabilisierenden Saccharose-Gradienten, wie sie erfolgreich bei der Präparation von Phycobiliproteiden von KÖST (1974) durchgeführt worden war. Die Fokussierung erfolgte mit einer 110 ml Säule (LKB 8101) unter Wasserkühlung ($\pm$ 12°C) in einem pH-Gradienten von 4 - 9. Als Elektrodenlösungen dienten 10 ml Phosphorsäure sowie 0.4 ml frisches Äthanolamin in einer Zuckerlösung (14 ml Wasser, 12 g Saccharose). Der Gradient wurde linear aus den beiden nachfolgenden Lösungen gegossen: 42 ml wässrige zu fokussierende Probe mit 28 g Saccharose und 1.88 ml Ampholine (Servalyt T, 4 - 9) sowie 60 ml Wasser mit 0.63 ml Ampholine. Nach 23 h bei 5 mA/600 V Endleistung wurde die Fokussierung beendet und der Gradient fraktionsweise abgepumpt.

15.2 Diskontinuierliche Gel-Elektrophorese

Für analytische wie auch präparative Zwecke wurde die diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disc - PAGE) eingesetzt. Die Gele wurden entweder als Röhrchen-

gele gegossen ($0.197 \text{ cm}^2 \times 6.5 \text{ cm}$ Trenngel; 1.5 cm Sammelgel), oder als vertikales Flachgel mit einer Breite von 15 cm , $10 - 20 \text{ cm}$ Länge, $1 - 3 \text{ mm}$ Dicke bei einer Sammelgelhöhe von $1.5 - 2 \text{ cm}$. Je nach Gel konnten so Probenvolumina von $10 \mu\text{l}$ bis 7 ml aufgetrennt werden. Die spezifische Dichte der Proben wurde mit Saccharose erhöht, Bromphenolblau diente als Frontmarker. Die genaue Gel-Zusammensetzung wurde der zusammenfassenden Darstellung von MAURER (1981) entnommen. Bei gleichbleibendem Sammelgel (3% Acrylamid, 0.1% Bisacrylamid, pH 6.8) wurden Trenngele (pH 8.7) verschiedener Acrylamid-Konzentrationen ($5 - 17.5\%$) verwendet. Als Elektrodenpuffer diente ein Tris-/Glycin-Puffer (25 mmol/l Tris, 192 mmol/l Glycin). Die elektrophoretische Trennung wurde unter Kühlung ($4 - 10^\circ\text{C}$) bei konstantem Stromfluß von 3 mA/Röhrchen bzw. $25 - 35 \text{ mA}$ bei Flachgelen durchgeführt.

Denaturierende Elektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wurde mit dem von LÄMMLI (1970) beschriebenen System in Flachgelen (s.o.) durchgeführt. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele betrug 10 oder 12.5% . Die zu analysierenden Proben enthielten $0.8 \mu\text{mol}$ Tris, 2% SDS, 5% MSH, 10% Glycerin und $0.8 \mu\text{g}$ Bromphenolblau bei einem pH von 6.8 in einem Gesamtvolumen von $80 \mu\text{l}$. Nach 5 Min. Inkubation bei 96°C wurden die Proben - wie beschrieben - elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Gele wurden entweder für Blotting-Techniken weiterverwendet (II. 7.6), auf STOX-Aktivität hin analysiert und eluiert (III. 2.4), oder die aufgetrennten Proteine angefärbt (II. 7.4). Gele, welche autoradiographisch ausgewertet werden sollten, wurden zur Erhöhung der Signalausbeute 30 Min. mit einer Verstärkerlösung (Amplify, Amersham Buchler, Braunschweig) getränkt und getrocknet (Geltrockner, LKB). Glykoproteinfärbung erfolgte modifiziert nach SEGREST und JACKSON (1972). Die nativen Gele wurden dazu nach der Elektrophorese 1.5 h in 7.5% Essigsäure fixiert, anschließend 45 Min. im Dunkeln bei 4°C in 0.2% Natriumperjodat (Sigma),

dann 50 Min. bei 4°C in Schiff'schem Reagens (Merck) inkubiert und schließlich bei Raumtemperatur mit 10% Essigsäure entfärbt. Rote Banden zeigten das Vorliegen von Glykoproteinen an.

III. ERGEBNISSE

1. Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)

1.1 Optische Tests

Wesentlicher Faktor für den erfolgreichen Nachweis, die Reinigung und Charakterisierung einer unbekannten Enzym-Aktivität, ist die Verfügbarkeit von präzisen, reproduzierbaren und genügend empfindlichen spezifischen Testmethoden. Der direkteste Weg zur Quantifizierung einer enzymatischen Reaktion ist die unmittelbare Erfassung des interessierenden Reaktionsprodukts, welches sich im günstigsten Fall in einer leicht meßbaren Weise von dem zugehörigen Substrat unterscheidet. Wie in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt wird, unterscheiden sich Substrat und oxi-

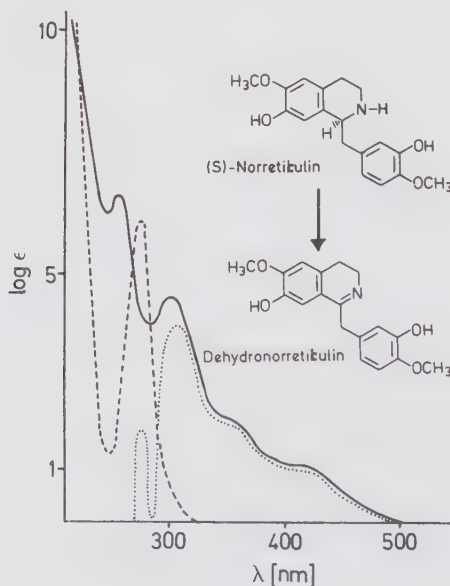


Abbildung 6 UV-Absorptionsspektrum von Norretikulin (-----), 1,2-Dehydronorretikulin (—) sowie deren Differenzspektrum (.....) in Boratpuffer (0.1 mol/l, pH 8.9). Die enzymatische Oxidation läßt sich bei 340 nm in einem optischen Test quantifizieren.

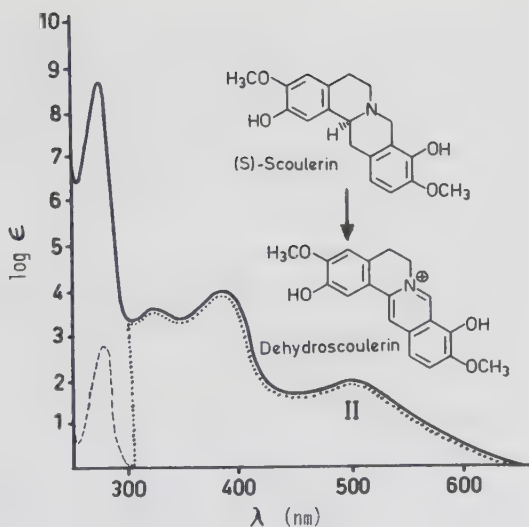


Abbildung 7 UV-Absorptionsspektrum von Scoulerin (-----), Dehydroscoulerin (——) sowie ihr Differenzspektrum (.....) in Boratpuffer (0.1 mol/l pH 8.9). Die enzymatische Oxidation läßt sich bei 374 nm in einem optischen Test quantifizieren.

diertes Produkt im Fall des 1-Benzylisochinolins (S)-Norretikulins als auch des Tetrahydroprotoberberins (S)-Scoulerins signifikant in ihrem Absorptionsverhalten jenseits von ca. 320 nm Wellenlänge. Verfolgt man also die enzymatische Reaktion photometrisch bei einer geeigneten Wellenlänge, bei welcher das Substrat keine Absorption zeigt, läßt sich die Produktbildung und damit die Enzym-Aktivität nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz über den Extinktions-Koeffizienten errechnen.

Nachdem die Extinktions-Coeffizienten der oxidierten Produkte häufig nicht bekannt waren, zudem bei einigen Protoberberinen je nach Protonierungsgrad verschiedene Resonanzstrukturen ihrer Anionen mit entsprechend korrelierten Absorptionsverschiebungen beschrieben sind (CAVA et al., 1965), mußten einige Extinktions-Coeffizienten erst bestimmt werden.

Waren größere Mengen Materials vorhanden, konnte die molare Extinktion über die eingewogene Substanzmenge ermittelt werden. Waren nur mg-Mengen von Referenzprodukten verfügbar, wurde wie folgt vorgegangen. Eine unbekannte Menge der oxidierten Verbindung wurde in Boratpuffer (0.1 mol/l; pH 8.9) soweit möglich gelöst, restliches 5 Min. abzentrifugiert und ein UV-Spektrum des Überstands aufgenommen. Zugabe von ca. 0.2 mg NaBH_4 führte zu einer quantitativen Reduktion, ohne das Volumen zu verändern (II. 4.1). Über den bekannten Extinktions-Coeffizienten des reduzierten Produkts konnte die Konzentration im Ansatz ermittelt werden. Da die Alkaloid-Konzentration unverändert geblieben war, ließen sich leicht für die geeigneten Wellenlängen Extinktions-Coeffizienten berechnen, welche zudem im wässrigen Milieu bei dem Test pH-Wert 8.9 ermittelt waren. Die jeweils verwendeten Extinktions-Coeffizienten sind, soweit nicht bereits hier angeführt, in III. 3.11 angegeben.

Der mit (S)-Norretikulin als Substrat durchgeführte optische Test enthielt standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 700 μl bei pH 8.9 70 μmol Borat, 70 nmol (S)-Norretikulin und bis zu 200 μg Protein. Inkubation erfolgte bei 25°C. Die mit der Produktbildung verbundene Zunahme der Extinktion wurde bei 340 nm registriert und konnte über den Extinktions-Coeffizienten von 1,2-Dehydronorretikulin ($\epsilon_{340} = 3.25 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$; d.h. $E_{340} = 3.25$ für 1 mmol/l) als Enzym-Aktivität ausgedrückt werden. Ansätze ohne Substrat bzw. mit abgekochtem Enzym ceteris paribus dienten als Kontrolle. Der Test zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Produktbildungsrate. Mit Tetra-

hydroprotoberberinen wurde der Test entsprechend durchgeführt. Zur Bestimmung der enzymatischen Oxidation von (S)-Scoulerin wurden in den oben beschriebenen Ansatz 100 nmol (S)-Scoulerin als Substrat eingesetzt. Quantifiziert wurde die enzymatische Produktbildung bei 374 nm mit einem Extinktions-Koeffizienten von $10.4 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Durch Variation des Substrats konnte dieser Test mit über 30 verschiedenen Substraten, überwiegend 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine, durchgeführt werden.

Neben dem quantitativen optischen Test wurden qualitative optische Schnelltests entwickelt, um z.B. in fraktioniert aufgefangenen Säuleneluatn die gesuchte STOX-Aktivität lokalisieren zu können. Typischerweise wurden dazu in Mikrotiterplatten 100 µl Boratpuffer (0.1 mol/l, pH 8.9) vorgelegt, 50 µl Enzymlösung zupipettiert und die Reaktion mit 50 µl Substrat gestartet. Als Substratlösungen (1 mg/ml) diente eine wässrige (S)-Norretikulinlösung oder eine schwach saure (pH 6) Lösung (R,S)-Canadin. Gelbfärbung variiert die Fraktionen mit der gesuchten STOX-Aktivität. Quantifiziert werden konnte die Aktivitätsverteilung durch photometrische Auswertung der Mikrotiterplatten mit Hilfe des Photometers MR 600, Microplate Reader, von Dynatech (Denkendorf) bei 410 nm. Dieser Test konnte mit allen für den optischen Test geeigneten Substanzen durchgeführt werden.

1.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis

Der chromatographische Produktnachweis ist oft ein guter Hinweis auf die vermutete enzymatische Umsetzung. So konnte die enzymatische Oxidation von (S)-(8- ^{14}C)-Scoulerin (enzymatisch präpariert aus (S)-(N- $^{14}\text{CH}_3$)-Retikulin mit Berberinbrücken-Enzym; vgl. dazu STEFFENS et al., 1985), von (S)-(N- $^{14}\text{CH}_3$)-Retikulin, aber auch entsprechender unmarkierter Verbindungen Dünnschicht-chromatographisch nachgewiesen werden (II. 14, Laufmittel 2,5,6). Dehydroscoulerin war dazu als Referenzsubstanz synthetisiert worden (II. 4.3).

Hinweise auf die Produktidentität erbrachte der Vergleich von eingesetztem Substrat und NaBH_4 -reduziertem Produkt, welche im vorliegenden Fall identisches Laufverhalten zeigten.

1.3 Radioimmunologische Analyse

Niedermolekulare pflanzliche Inhaltsstoffe lassen sich seit Jahren erfolgreich radioimmunologisch bestimmen (WEILER, 1983). Die Ausarbeitung spezifischer Radioimmuntests zur Bestimmung verschiedener Opium-Alkaloide, speziell von (S)-Retikulin und (S)-Norretikulin durch WIECZOREK (1984), macht es möglich, die STOX-katalysierte Oxidation von (S)-Retikulin bzw. (S)-Norretikulin radioimmunologisch zu verfolgen (II. 7.7). Während sich der Verbrauch des (S)-konfigurierten Substrats direkt in aliquoten Teilen eines Enzymansatzes bestimmen ließ, war die Messung der Zunahme an gebildetem oxidierten Produkt nur indirekt über dessen stöchiometrische Reduktion zum (R)-Enantiomeren möglich. Der hohen Empfindlichkeit (fmol-Bereich) der Tests stand die zeitaufwendige Durchführung entgegen, so daß nur in Spezialfällen (z.B. III. 5.3) darauf zurückgegriffen wurde.

1.4 Tritium-Ausbaute

Die STOX-katalysierte enzymatische Oxidation von Benzylisochinolin verläuft unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Wasser (III. 3.2). Bietet man der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase daher geeignete Tritium-markierte Substrate an, läßt sich aus der stöchiometrischen Bildung von radioaktiv markiertem H_2O_2 und H_2O auf die Menge oxidierten Substratmoleküle schließen. Als Substrate fanden Verwendung: (R,S)-[1- ^3H]-Retikulin (0.29 GBq/mmol) und (R,S)-[8,14- $^3\text{H}_2$]-Scoulerin (12.2 GBq/mmol; II. 4.4). Durch Zugabe unmarkierter Substanz wurden die markierten Substrate auf die im Test erwünschte spezifische Radioaktivität verdünnt. Der Stan-

dard-Tritium-Ausbauteil enthielt in einem Gesamtvolumen von 250 µl bei einem pH von 8.9 25 µmol Boratpuffer, 3.2 nmol (56 000 dpm) (R,S)-[1-³H]-Retikulin und bis zu 100 µg Protein. Nach 1-stündiger Inkubation bei 30°C wurde das Substrat durch Zugabe von 200 µl Kohlesuspension (250 mg Dextran und 10 g aktivierte Holzkohle in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung) an die Kohlenstoffpartikel adsorbiert. Der Ansatz wurde geschüttelt (30 s), 5 Min. abzentrifugiert (Eppendorf System) und die Radioaktivität in einem 200 µl Aliquot des klaren Überstands bestimmt. Mehr als 50% des im Substrat gebundenen Tritiums wurden nie im wässrigen Überstand gefunden, was dadurch erklärbar ist (III. 3.1), daß ein am chiralen C-Atom markiertes racemisches Substrat von einem strikt stereospezifischen Enzym umgesetzt worden war (Abbildung 8).

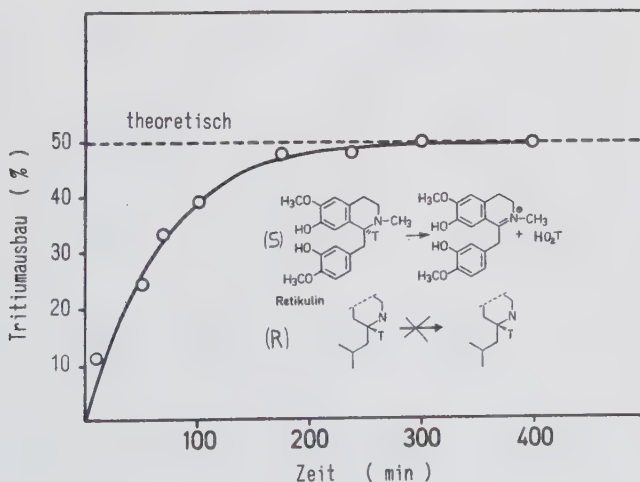


Abbildung 8

STOX-katalysierter Tritiumausbau aus (R,S)-[1-³H]-Retikulin. Wie in III. 3.1 ausgeführt wird, kann nur das (S)-Enantiomer enzymatisch oxidiert werden, das (R)-Enantiomer bleibt unverändert. Dies erklärt den gefundenen 50%-Wert als Maximalwert des Tritiumausbaus.

In gleicher Weise konnte der Test auch mit (R,S)-[8,14- $^3\text{H}_2$]-Scoulerin durchgeführt werden, nur daß dem ansonsten gleichen Testansatz 62.5 nmol (R,S)-Scoulerin (45 000 dpm) zugesetzt wurden.

Maximal 37.5% des Substrat-gebundenen Tritiums konnten enzymatisch in die wässrige Phase freigesetzt werden. Wie in Abbildung 9 auch dargestellt ist, läßt sich dieser Wert nur dadurch erklären, daß ein 2-fach markiertes racemisches Substrat enantiospezifisch enzymatisch umgesetzt wird.

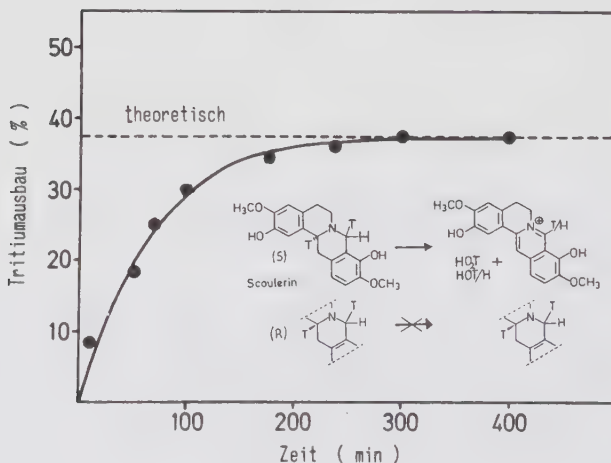


Abbildung 9 STOX-katalysierter Tritiumausbau aus (R,S)-[8,14- $^3\text{H}_2$]-Scoulerin. Wie in III. 3.1 ausgeführt wird, kann STOX nur die (S)-Form oxidieren. Das Oxidationsprodukt des (S)-Enantiomeren enthält mit 50% Wahrscheinlichkeit noch H am C-8, was den 37.5% Wert des enzymatisch abspaltbaren Tritiums erklärt.

16 875 dpm entsprachen also der enzymatischen Oxidation von 31.2 nmol (S)-Scoulerin. Alle Werte wurden um den Grundradioaktivitätsspiegel korrigiert, wie er in Referenzansätzen mit abgekochten Enzympräparationen gemessen werden konnte (4 - 7%).

Der Tritium-Ausbaustest wurde auch genutzt, um kleine Enzymaktivitäten qualitativ zu erfassen. Zur Anwendung kam der qualitative Tritium-Ausbaustest bei der Analyse von Elutionsprofilen aller Art. Der Test wurde hierzu exakt - wie oben beschrieben - ausgeführt, lediglich radioaktives Substrat wurde trägerfrei (80 000 dpm (R,S)-[1-³H]-Retikulin; 0.29 GBq/mmol), d.h. ohne zusätzliches nichtmarkiertes Substrat, eingesetzt.

1.5 Vorstellung weiterer Testmöglichkeiten

Die Aufklärung der Stöchiometrie (III. 3.3) der STOX-katalysierten Reaktion führte zur Ausarbeitung weiterer Testmöglichkeiten. Wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt wird, ist die enzymatische Oxidation mit dem Verbrauch von Sauerstoff verbunden, was es möglich macht, die Reaktion mit einer O₂-Elektrode zu verfolgen (II. 11). Des weiteren entsteht enzymatisch Wasserstoffperoxid, welches sich über Peroxidase gekoppelte Farbtests bestimmen läßt (II. 12). Eine Ausweitung des optischen Tests mit Canadin als Substrat zu einem höchst empfindlichen Fluoreszenztest wurde dadurch erreicht, daß aliquote Teile des Enzymansatzes auf Filterpapier getüpfelt wurden (WHATMAN 3 M) und die getrockneten Flecken mit Licht von 366 nm Wellenlänge bestrahlt wurden. Das stark gelb fluoreszierende Produkt, Berberin, läßt sich so noch in Spuren nachweisen (WALLSCHLÄGER, 1984). Über die Fluoreszenz wie über die Farbentwicklung geeigneter Substrate konnte darüber hinaus ein in situ-Test zur Lokalisation von STOX in Polyacrylamidgelen entwickelt werden (III. 2.4). Schließlich läßt sich STOX nicht nur über seine Substrate und Produkte messen, sondern seine Identität kann auch über spezifische Anti-STOX-Antikörper mittels Immundiffusions- und Blotting-

techniken (II. 7.3-7.6) nachgewiesen werden. Tabelle 1 faßt die Nachweismöglichkeiten zusammen.

Die zu Eingang des Kapitels erhobenen Anforderungen an ein enzymatisches Testsystem, wie sie H.U. BERGMAYER immer wieder zitiert (1984), werden von den ausgearbeiteten Tests erfüllt. Mit dieser Palette verschiedenster Testmöglichkeiten sollte nun versucht werden, die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität aufzuspüren und zu reinigen.

	Parameter	Meßmethode
Substrate	Tetrahydroprotoberberine	Dünnschicht-chromatographie
	1-Benzylisochinoline	
	(S)-Norretikulin	Radioimmuntest
	Sauerstoff	O ₂ -Elektrode
Produkte	Protoberberine	Dünnschicht-chromatographie
	Dehydro- Benzylisochinoline	Optischer Test
		Fluoreszenztest
	1,2-Dehydronorretikulin (reduziert)	Radioimmuntest
	³ HO ₂ H, ³ HOH	Szintillations-spektroskopie
Katalysator	STOX-Protein	Immundiffusion Immunoblotting

Tabelle 1 Quantitative und qualitative Bestimmungsmöglichkeiten von STOX

2. Reinigung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) aus Zellsuspensionskultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.

Die Gewinnung eines homogenen, reinen Enzyms ohne Verlust an Aktivität ist das Wunschziel jeder Proteinreinigung. Sinnvoll und zweckmäßig ist es jedoch, die Protein-Anreicherung mit klaren Zielvorstellungen zu betreiben: Will man reines Protein gewinnen, lassen sich Kompromisse bei der Aktivitäts-Ausbeute machen, Abstriche bei der Reinheit hingegen, wenn man in kurzer Zeit hohe Enzym-Aktivitäten präparieren will. Nach beiden Strategien wurde vorgegangen: Reinheit, Abschnitt 2.1 - 2.5, Aktivität, Abschnitt 2.6.

Die Präparation eines Enzym-Rohextraktes aus Zellsuspensionsgewebe von Berberis wilsoniae var. subcaulialata erfolgte wie in II. 5 beschrieben. 220 g tiefgefrorenes Gewebe (12.2 g Trockengewicht) wurden in 440 ml Aufschlußpuffer (Kaliumphosphat 50 mmol/l, pH 7.4; 5 mmol/l MSH) zu einem homogenen Brei verrührt, durch vier Mullagen gepreßt und der stark gelbgefärbte Pressaft bei 10 000 g klar zentrifugiert (10 Min., GSA-Rotor). Dem eisgekühlten Extrakt wurden portionsweise 280 g gemahlenes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben (70% Sättigung) und das ausgefallene Protein 10 Min. lang bei 10 000 g pelletiert. Der Niederschlag konnte in 20 ml Aufschlußpuffer resuspendiert werden, wurde klar zentrifugiert (5 Min. 7 000 g, SS 34 Rotor) und über Gelfiltration aufgetrennt.

2.1 Gelfiltration an Ultrogel AcA 44

Die von Größe und Form abhängige Verteilung eines Makromoleküls zwischen einer definiert porösen Matrix und dem sie umgebenden Lösungsraum wird seit über 25 Jahren zur Proteintrennung ausgenutzt. Die schonende und gut reproduzierbare Gelfiltrationstechnik wurde mit einem Polyacrylamid-/Agarose-Gel (Ultrogel AcA 44) durchgeführt, für welches ein Fraktionierungsbereich von 12 - 130 kD bei globulären Proteinen angegeben wird. Die 20 ml Probe wurde an einer mit Auf-

schlußpuffer äquiliibrierten Säule ($4.15 \text{ cm}^2 \times 94 \text{ cm}$) mit 18 ml/h aufgetrennt. Die 100 Fraktionen ($\hat{=}$ 3 ml) wurden auf ihren STOX-Gehalt mittels qualitativer optischer Tests ((S)-Norretikulin, (S)-Scoulerin, (S)-Retikulin als Substrate) und des ^3H - Ausbauteests mit (R,S)-(1- ^3H)-Retikulin analysiert. Abbildung 10 zeigt das charakteristische Elutions-

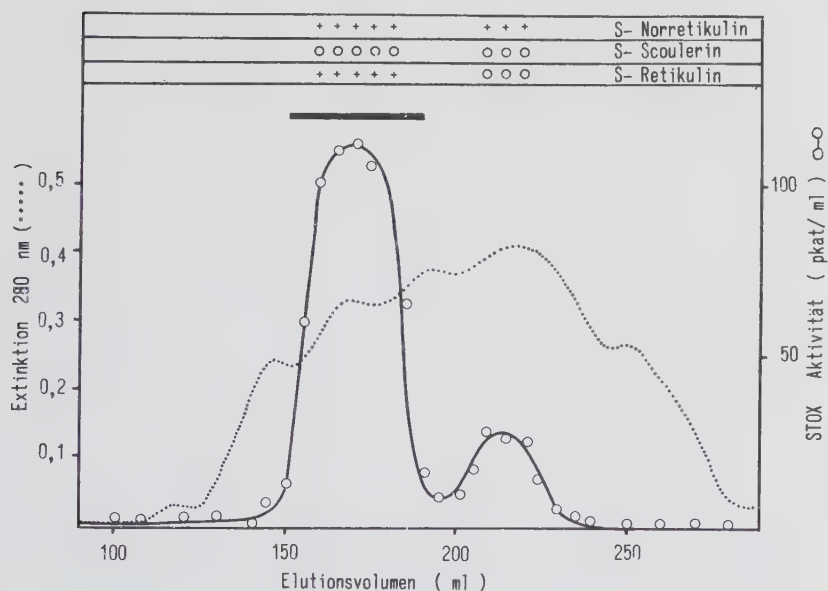


Abbildung 10 Auftrennung eines konzentrierten Proteinoxtrakts (70% Sättigung Ammoniumsulfat) aus *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*-Zellkultur (20 ml, 820 mg Protein) durch Gel-filtration, an Ultrogel ACA 44. Säulenabmessungen: $4.15 \text{ cm}^2 \times 94 \text{ cm}$; Flußrate: 18 ml/h ; Elutionsmittel: Aufschlußpuffer. STOX-Enzymaktivität wurde im ^3H -Ausbauteast und im qualitativen optischen Test mit 3 Substraten ((S)-Norretikulin, (S)-Scoulerin, (S)-Retikulin) gemessen, wobei sich die Testansätze gelb (+++) oder rot (ooo) verfärbten. Der Balken gibt den Teil des Eluats wieder, welcher vereinigt und zur weiteren Reinigung von STOX verwendet wurde.

profil. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase zeigte reproduzierbar eine zweigipflige Aktivitäts-Verteilung mit einer dominierenden Hauptaktivität und einer später eluierten kleinen Nebenaktivität mit offenbar geringerem Molekulargewicht. Im optischen Schnelltest mit S-Norretikulin als Substrat, zeigten gelbgefärbte Fraktionen, mit S-Scoulerin als Substrat die rote Färbung der Ansätze die Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase an. (S)-Retikulin als Substrat führte zu gelber Färbung der Hauptaktivität und roter Anfärbung der Fraktionen, welche die Nebenaktivität enthielten. Einfach erklärt wird dieser Befund durch die Überlagerung der Nebenaktivität von STOX mit dem Berberinbrücken-Enzym, was bereits P. STEFFENS (1984) beschrieben hatte. Dieses Enzym setzt (S)-Retikulin zu (S)-Scoulerin um, welches nach STOX-Oxidation zu der beschriebenen Rotfärbung der Ansätze führt. Die Fraktionen der Hauptaktivität wurden vereinigt und weiter aufgereinigt. Die Ausbeute des Gelfiltrationsschritts war üblicherweise größer als 100%, was durch die Abtrennung niedermolekularer, hemmender Substanzen erklärbar ist, welche auch zu dem hohen formalen Anreicherungsfaktor (16.5-fach) bei diesem Schritt beisteuert.

2.2 Dye-ligand Chromatographie an Matrex Blue A

Die zufällige Beobachtung der Wechselwirkung organischer Textilfarbstoffe mit Proteinen eröffnete der Proteinreinigung ein neues Feld. Durch Ankopplung von Cibacron Blau F3G-A an quervernetzte Agarose konnte eine Matrix entwickelt werden, deren gefärbte Liganden durch ihre Ähnlichkeit mit ADP-Ribose bevorzugt Dehydrogenasen, aber auch eine Vielzahl nicht Nukleotid-bindender Proteine binden. Gegenüber reinen Affinitätsmatrizes zeigt dieses Pseudo-Affinitäts-Absorbens eine vielfach höhere Proteinbindungskapazität. Wenngleich keine der verfügbaren Triazinfarbstoffsäuren (Amicon Matrex Blue A, Blue B, Rot, Grün, Orange) STOX binden konnte (in Kaliumphosphat-Puffer pH 7.6 50 mmol/l), konnte doch die hohe Bindungskapazität für Proteine von

Matrex Blue A ausgenutzt werden, ca. 40% des Proteins der applizierten Probe zu adsorbieren, ohne die STOX-Aktivität stark zu beeinträchtigen. Gleich gute Erfolge konnte man mit Matrex Red erzielen. Durchgeführt wurde dieser Chromatographieschritt, indem 42.5 ml des STOX-haltigen Gelfiltrationseluats unter Kühlung (12°C) langsam (8 ml/h) über eine Blue A- Säule (0.64 cm² x 6.6 cm) gepumpt wurde. Das Eluat wurde unfraktioniert aufgefangen und über Ionenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt. Zur Regeneration wurde die Säule mit 8 mol/l Harnstoff gewaschen. Die 1.35-fache Anreicherung in diesem Schritt beruht also nicht auf Adsorption/Desorption der gesuchten STOX-Aktivität, sondern im Sinn eines "negativen" Chromatographie-Schritts auf der Bindung unerwünschten Proteins.

2.3 Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel

Die reversible Adsorption von sauren Proteinen an Anionenaustauscher wird in der Proteinreinigung häufig ausgenutzt. Das zugrundeliegende Prinzip beruht darauf, daß Proteine, deren isoelektrischer Punkt saurer als der verwendete Puffer ist, bei diesem pH-Wert als Nettoanion vorliegen. In Gegenwart einer positiv geladenen Matrix (Diethylaminoethylreste, DEAE) verteilen sich demnach diese gelösten Proteine entsprechend ihrer inhärenten Ladungen zwischen der flüssigen und der festen Phase, in diesem Fall entsprechend derivatisierte spärliche Cellulosekugeln. Zugabe komplementär zur Matrix geladener Chloridionen schwächt die elektrostatische Wechselwirkung von absorbiertem Protein und DEAE-Gruppen, Proteinanion kann gegen Chloridanion getauscht werden und die Desorption des Proteins vom Ionenaustauscher ist erreicht.

Die Fraktionierung der durch Gelfiltration und Farbstoffsäule vorgereinigten (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase an diesem Ionenaustauscher ist in Abbildung 11 dargestellt. Die 43 ml-Probe war dazu auf die Säule (6.6 cm² x 5.3 cm) aufgegeben worden (0.5 ml/Min.). Die Elution erfolgte mit

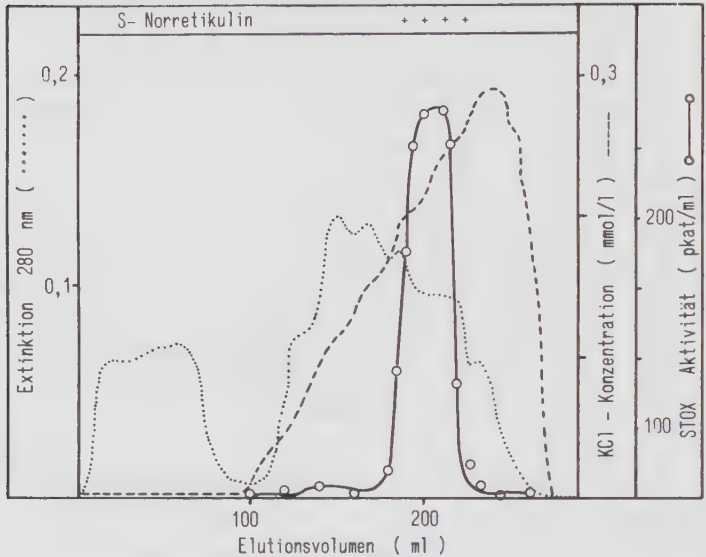


Abbildung 11 Fraktionierung von vorgereinigtem STOX (43 ml, 38.7 mg Protein) durch Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel. Säulenabmessung: 6.6 cm² x 5.3 cm; Flußrate: 18 ml/h; Elution: linearer KCl-Gradient 0-300 mmol/l in Aufschlußpuffer. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Abbildung 10 angegeben. Der Verlauf des KCl-Gradienten wurde über die Leitfähigkeit des Eluats bestimmt. Die durch einen Balken angezeigte Eluatfraktion wurde vereinigt und zur weiteren Reinigung von STOX verwendet.

einem linearen KCl-Gradienten (0 - 300 mmol/l KCl in Kaliumphosphat-Puffer 50 mmol/l pH 7.4) mit einer Flußrate von 0.3 ml/Min. Wenngleich die 2.4-fache Anreicherung für diesen Schritt gering erscheint, trennt dieser Schritt doch über 80% Protein ab. Für die Aktivitätsverluste ist die in diesem Verfahren unvermeidliche Salzexposition verantwortlich. Daher wurde versucht, ein sehr schnelles, schonendes Verfahren zu entwickeln, das Eluat des Ionenaustauschers zu entsalzen. Da

als terminaler Anreicherungs-schritt eine präparative Elektrophorese ausgearbeitet wurde, sollte der Entsalzungsschritt darüber hinaus möglichst mit einer gleichzeitigen Konzentrierung verbunden sein. Als vorteilhafteste Lösung erwies sich eine Weiterentwicklung der von RIVAS et al. (1982) beschriebenen Kombination eines Ionenaustauschers mit einer Gel-filtrationsmatrix. In eine Säule von 0.9 cm Durchmesser wurde 12 cm hoch Sephadex G 25 gegossen, und darüber 1.5 cm des oben beschriebenen DEAE-Sephacel geschichtet. Die KCl-haltige Fraktion wurde nach Senkung der Ionenstärke (Zugabe eines gleichen Volumenanteils destillierten Wassers) über die Kombinationssäule gepumpt (0.5 ml/Min.), wobei das Protein wie erwartet quantitativ im oberen Säulenbereich gebunden wurde. Mit einem Puls (2 ml) von 0.5 mol/l KCl konnte das Protein vollständig vom Ionenaustauscher abgelöst und im unmittelbar anschließenden Gel-filtrationsmedium von den unerwünschten Salzionen abgetrennt werden (0.3 ml/Min.). Leitfähigkeitsmessung und Proteinbestimmung der Eluatfraktionen zeigte, daß die Abtrennung tatsächlich erreicht wurde. Bei annähernd 100% Ausbeute an Protein und STOX-Aktivität war das Volumen um einen Faktor 7.7 verkleinert worden. Wegen der Schnelligkeit der Methode und der guten, reproduzierbar erzielten Ausbeuten waren andere Verfahren, wie Ammoniumsulfatfällung/Dialyse, Ultrafiltration oder Hohlfaserdialyse auf dieser Aufarbeitungsstufe nicht konkurrenzfähig.

2.4 Präparative Disc-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel

Während elektrophoretische Techniken in Protein- und Nukleinsäureanalytik eine dominierende Rolle spielen, sind sie zur präparativen Darstellung von aktiven Enzymen oft nur bedingt tauglich. Limitierend wirkt sich oft die Schwierigkeit aus, das gesuchte Enzym nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung schnell zu lokalisieren. So müssen meist große Gelabschnitte auf Verdacht eluiert und analysiert werden, wobei die hohe mögliche Trennleistung der Technik nicht optimal ausgenutzt werden kann. Erklären läßt sich

das hohe Auflösungsvermögen der diskontinuierlichen Elektrophorese (Sammel- und Trenngel mit einem verschiedenen pH- und unterschiedlichem Vernetzungsgrad) dadurch, daß sie die für jedes Protein einzigartige Kombination zweier unterschiedlicher Kenngrößen, Größe und Nettoladung des Moleküls, für die Auftrennung ausnützt. Die Entwicklung einer sehr schnellen Detektionsmethode auf STOX-Aktivität in Gelen machte es möglich, Elektrophorese präparativ mit guten Ausbeuten durchzuführen. Nach elektrophoretischer Auftrennung des konzentrierten und entsalzten Proteins in einem präparativen Flachgel (II. 15.2; 10% Acrylamid; 15 h bei 20 mA Sammelgel und 30 mA Trenngel; Laufstrecke 20 cm) wurde ein schmaler Streifen aus der Mitte des Gels ausgeschnitten und in ein vorbereitetes Reagenzglas überführt. Das Röhrchen enthielt 0.5 mg (S)-Scoulerin in 2 ml Boratpuffer (0.1 mol/l pH 8.9). Nach bereits wenigen Minuten konnte bei Betrachtung unter einer UV-Lampe (366 nm) eine diskrete orange fluoreszierende Bande auf dem Gel beobachtet werden (R_f 0.35 - 0.45), welche sich bei Tageslicht betrachtet langsam rot färbte. Diese spezifische in situ Anfärbung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase konnte analog dem optischen Test mit verschiedenen Substraten durchgeführt werden. So färbt sich die STOX-Bande z.B. in Gegenwart von (S)-Norretikulin gelb. Sind große STOX-Mengen in einer engen Bande auf dem Polyacrylamidgel konzentriert, ist selbst dieser einfache und schnelle Test überflüssig. Betrachtet man nämlich mit geübtem, dunkeladaptiertem Auge das Polyacrylamidgel unmittelbar nach der Elektrophorese unter der UV-Lampe (366 nm), läßt sich in Abwesenheit von Substrat eine schwach gelbgrünliche fluoreszierende Bande erkennen. Diese entspricht exakt dem in den Farbttests anfärbbaren Bereich. Somit konnte die STOX-haltige Polyacrylamidzone ohne jedwelle Verzögerung aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden. Die Elution erfolgte durch Diffusion oder über Elektroelution, wobei hinsichtlich der Ausbeuten die beiden Verfahren gleich gute Ergebnisse zeigten. Beim Diffusionsverfahren wurde das Gel in kleine Stücke zerteilt und zusammen mit wenigen ml

Boratpuffer 2 x 24 h auf einem Rotationsschüttler (100 Upm) geschwenkt. Die Gelstückchen wurden abzentrifugiert und der Überstand durch Watte filtriert. Zur elektrophoretischen Elution wurden die Gelstreifen zusammen mit 2 ml Elektrophoresepuffer in einem Dialyseschlauch in einer Horizontalelektrophoresekammer (BRL H 6) quer zum Stromfluß ausgerichtet. Nach 2 h bei 20 mA wurde die Elektrodenpolung für 3 Min. vertauscht, um möglicherweise am Dialyseschlauch haftendes Protein abzulösen, und das Eluat herauspipettiert. In der Schnelligkeit der Methode liegt der Vorteil der Elektroelution. Der präparative Elektrophoreseschritt konnte dadurch mit einer Ausbeute an STOX-Aktivität von über 60% durchgeführt werden.

2.5 Zusammenfassende Darstellung und Dokumentation der Homogenität

Das beschriebene Verfahren lieferte eine STOX-Präparation, deren spezifische Aktivität den 155-fachen Wert des Rohextrakts erreichte bei einer Aktivitätsausbeute von 25%. Nach dem letzten Reinigungsschritt waren insgesamt 99.8% des Proteins im Verlauf der Anreicherungsprozedur abgetrennt worden. Die Tabelle 2 gibt einen zahlenmäßigen Überblick über das Reinigungsverfahren zur Darstellung von STOX. Eine elektrophoretische Analyse des gewonnenen Proteins auf nativen Gelen unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentrationen (5 - 15%) zeigte stets das Vorhandensein zweier Proteinbanden, deren Rf-Werte sich nur äußerst geringfügig unterschieden (Abbildung 12). Während mit der Zunahme der Acrylamidkonzentration die beiden Banden immer schärfer liefen, konnte in keinem System eine signifikante Trennung erreicht werden. Von Bedeutung war dies insofern, als zweifelsfrei festgestellt werden mußte, ob es sich bei einer der beiden Banden um eine Verunreinigung handelte. Die Antwort gab eine verlängerte Elektrophoresedauer in einem 15%igen Polyacrylamidgel (4 µg gereinigte STOX pro Röhrchen). Während die Rigidität des Gels die Diffusion erschwerte, waren die geringen Mobilitätsunterschiede ausreichend, um nach 16 h beide Banden signifikant getrennt zu haben. Das Gel

Reinigungs- stufe	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung (x-fach)
Rohextrakt	595	37.2	930	0.04	100	1
0-70% (NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung	20	35.0	820	0.04	94.1	1
ACA 44-Eluat	42.5	41.3	62.7	0.66	111.0	16.5
Matrex Blue A-Eluat	43.0	34.4	38.7	0.89	92.5	22.2
DEAE-Sephacel-Eluat	48.0	15.2	7.2	2.11	40.9	52.7
Kombinationssäule	6.2	15.4	7.0	2.20	41.4	55
Disc-Elektrophorese-Eluat	3.0	9.3	1.5	6.20	25.0	155

Tabelle 2 Anreicherung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase
aus Berberis wilsoniae var. subcaulialata-Zellkultur

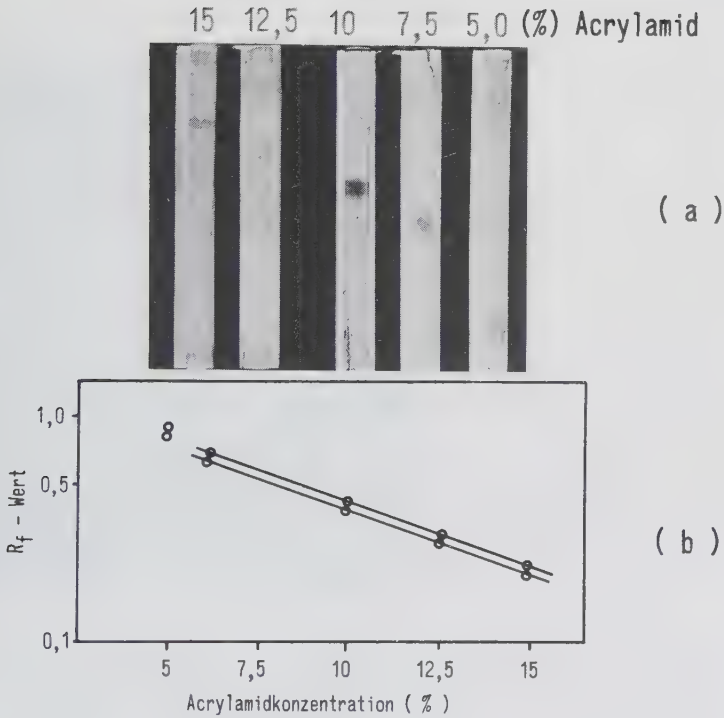


Abbildung 12 (a) Elektrophoretische Auftrennung von gereinigtem STOX in nativen Polyacrylamidgelen unterschiedlichen Acrylamidgehalts (4,4 µg gereinigtes STOX pro Röhrchengel). (b) Darstellung der relativen Mobilitäten beider Banden ($\log R_f$) in Abhängigkeit von Acrylamidkonzentration (T) - Ferguson Plot. Der lineare Kurvenabschnitt (7,5-15%) gibt den Bereich an, in welchem vergleichbare Auftrennungen erreicht werden können.

wurde in Längsrichtung halbiert, zur Hälfte auf Enzym-Aktivität, zur Hälfte auf Protein angefärbt. Beide Banden zeigten STOX-Aktivität (Abbildung 13a). Das gereinigte Enzym enthält also keine Verunreinigung.

Will man die Reinheit einer Enzym-Präparation zeigen, sind mehrere Vorgehensweisen möglich. Eine Strategie ist der Nachweis, daß das Proteinpräparat nur eine N-terminale Aminosäure besitzt. Da allerdings der N-Terminus blockiert und damit einer Analyse nicht zugänglich war (III. 3.10), wurde das vom LÄMMLI (1970) beschriebene Elektrophoreseverfahren eingesetzt. Bei dieser denaturierenden Disc-Elektrophorese in Gegenwart von SDS (II. 15.2) wird durch Anlagerung anionischer Detergenzmoleküle die Protein-Tertiärstruktur aufgefaltet und durch die Anwesenheit von β -Mercaptoäthanol (MSH) die Öffnung möglicher Disulfidbrücken der Peptidkette erreicht. Die Auftrennung der so dissoziierten Untereinheiten eines Proteins erfolgt nun, da das Ladungs-/Größenverhältnis für jedes Protein unter diesen Bedingungen gleich ist, ausschließlich über den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels.

Die Proteinfärbung des Gels zeigte eine etwas breitere Bande bei einem Molekulargewicht von 53 kD (Abbildung 13b). Eine weitere Reinigung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase war also nicht mehr nötig. Für besonders sensitive proteinchemische Untersuchungen wurde das elektrophoretisch saubere Protein allerdings noch über Gelpermeations-Chromatographie (TSK G 3000 SW-Säule, LKB) von undefinierten niedermolekularen Substanzen und störenden Salzen befreit (III. 3.10).

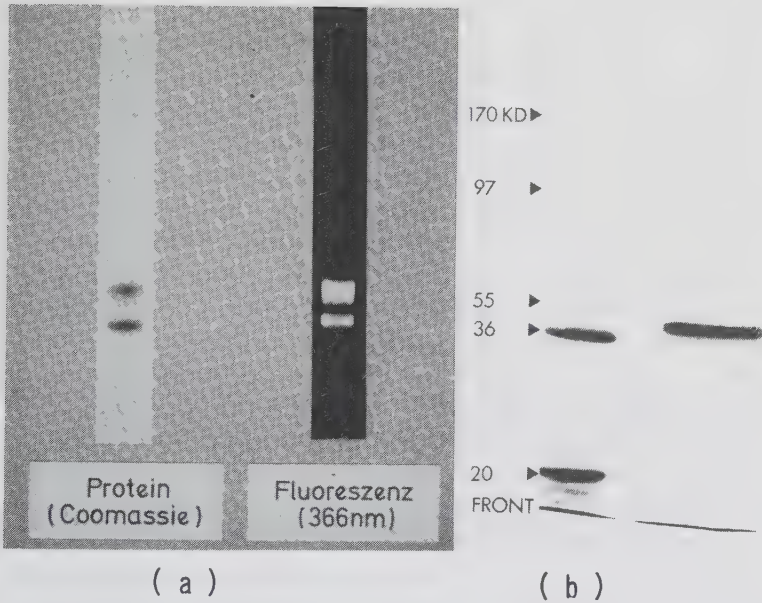


Abbildung 13 Protein- und Aktivitätsfärbung eines Polyacrylamidgels mit gereinigtem STOX.

- (a) Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie-R 250. Zur Aktivitätsfärbung wurde das Gel 5 Min. in Borat-gepufferter (0.1 mol/l pH 8.9) (S)-Scoulerinlösung (0.25 mg/ml) inkubiert und unter UV-Licht (366 nm) betrachtet.
- (b) Elektrophoretische Auftrennung von gereinigtem STOX (5 µg) in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (12.5% Acrylamid) unter denaturierenden Bedingungen. Die Zahlen geben die Molekulargewichte (kD) der Eichproteine an.

2.6 Verkürztes Anreicherungsverfahren zur präparativen Verwendung von STOX

Entscheidend für präparatives Arbeiten mit Enzymen ist eine ausreichend hohe enzymatische Aktivität. Diese sollte sich darüber hinaus möglichst einfach, ohne komplizierte Ausrüstung, am besten bei Raumtemperatur, gewinnen lassen. Für STOX wurde unter diesem Primat der Aktivität ein 3-stufiges Verfahren entwickelt, welches die geforderten Kriterien weitgehend erfüllt. Die erste Stufe, die Bereitung des Rohextrakts, wurde in der zu Beginn des Kapitels II. 2. beschriebenen Weise durchgeführt. Dazu wurden 1280 g Gewebe von Berberis wilsoniae var. subcaulialata mit 1800 ml Aufschlußpuffer 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und der Extrakt nach Mullfiltration - wie beschrieben - abzentrifugiert (10 Min., 7 000 xg). Der klare, stark gelb gefärbte Rohextrakt (360 nm Extinktionswert: 15.0; 4379 mg Protein; 1469 nkat) wurde im 2. Schritt durch zweimaliges Aufgeben auf eine Säule mit XAD Typ 2 (Korngröße 300 - 1000 µm; 10.6 cm² x 15 cm) von niedermolekularen Substanzen, überwiegend gelb gefärbten Protoberberinalkaloiden befreit (360 nm Extinktionswert: 0.58, d.h. 3.9% des Ausgangswerts) und das Eluat (3678 mg Protein, 2247 nkat) auf eine Ionenaustauschsäule aufgegeben (DEAE-Sephacel; 25 cm² x 5 cm). Das Gel wurde mit 0.7 l Phosphat-gepufferter KCl-Lösung (0.1 mol/l KCl in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer) gewaschen, die Waschfraktion verworfen. Elution des gebundenen Proteins erfolgte im 3. Schritt durch Zugabe von 350 ml 0.6 mol/l KCl in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer.

Tabelle 3 faßt diese STOX-Präparation zusammen. Die hohen Ausbeuten werden wesentlich durch die fast quantitative Adsorption hemmender niedermolekularer Substanzen durch XAD 2 erklärt, doch zeigt der Ionenaustauschschritt per se eine Ausbeute von 87%. Durch das Nachwaschen der Sephacelmatrix mit 0.1 mol/l KCl wurde eine weitgehende Abtrennung des möglicherweise den präparativen Einsatz störenden Berberinbrücken-Enzyms erreicht. Der schlechten Anreicherung entgegen steht die Schnelligkeit des Verfahrens, wel-

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Gesamt- Protein (mg)	spezif. Aktivität (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreiche- rung (x-fach)
Rohextrakt	2720	1469	4379	0.34	100	1
XAD 2-Filtrat	2700	2247	3678	0.61	153	1.8
DEAE-Sephacel- Eluat	340	1948	785	2.48	132	7.4

Tabelle 3 Präparationsschritte zur schnellen Gewinnung großer Aktivitätsmengen an STOX

ches gegenüber dem vorher beschriebenen (3.5 Tage für 6 nkat) auf Aktivität bezogen weit über tausendmal leistungsfähiger ist.

2.7 Affinitäts-chromatographische STOX-Reinigung

Das Konzept der Komplementarität biologisch aktiver Molekülspezies befruchtete nicht nur sämtliche Teilgebiete der Biochemie, sondern wurde sehr bald schon in unterschiedlichsten Formen zur Anreicherung spezifischer Biomoleküle ausgenutzt. Die molekulare Erkennung kann sich dabei auf weit verbreitete Strukturähnlichkeiten (Nukleotidbindungsstelle bei Dehydrogenasen), oder im anderen Extremfall auf ein einzigartiges Strukturmerkmal eines bestimmten Biomoleküls wie einer Rezeptorbindungsstelle oder einer speziellen, antigenen Determinante eines bestimmten Proteins beziehen. Die von KÖHLER und MILSTEIN (1975) begründete Hybridomatechnologie hat letzteren Fall möglich gemacht, indem sich mit ihr komplementäre Moleküle gewinnen lassen, welche im Idealfall eine einzige Struktur unter allen möglichen Strukturen erkennen. Der monoklonale Antikörper macht es dem modernen Biochemielabor somit möglich, buchstäblich im Trüben zu fischen. Diese elegante Methode, das hier gesuchte Protein, nämlich STOX, mittels spezifischer

monoklonaler Antikörper aus ungereinigten Proteinlösungen in einem Schritt gewinnen zu können, war durch die Vorarbeiten unseres Immunologielabors greifbar geworden. Fünf nicht näher charakterisierte Klone, welche Antikörper gegen STOX produzierten, waren von D. WALLSCHLÄGER (1984) isoliert worden. Ziel war es, den für Affinitäts-Chromatographie geeignetsten Klon zu identifizieren, in der Hoffnung, den hohen Reinheitsgrad des zeitaufwendigen 7-stufigen Anreicherungsprozesses mit der Schnelligkeit des im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Verfahrens zu kombinieren.

Folgende Strategie wurde eingeschlagen. Zunächst wurden mögliche Elutionsmittel gesucht, um die STOX /Antikörperdissoziation zu erreichen. Parallel dazu wurden Antikörper der 5 Hybridomaklone über Mäuseaszites produziert und an einem inerten Träger immobilisiert. Der geeignetste Antikörper wurde durch Bindungs-/Elutionsversuche ausgewählt, das System auf präparative Dimensionen vergrößert und die Affinitäts-chromatographische STOX-Präparation versucht. Die Ergebnisse der angegebenen Schritte sind in der dargelegten Reihenfolge nachstehend beschrieben.

Die Dissoziation des Antigen-/Antikörperkomplexes ist nur dann sinnvoll durchführbar, wenn die verwendete Methode das Antigen in seiner gewünschten Funktionalität nicht nachhaltig schädigt. Nachdem die Elution einer Affinitätssäule in der Regel kein sehr rascher Prozeß ist, wurde zunächst getestet, welche der in der Literatur beschriebenen Agentien von STOX über einen Zeitraum von einer bis wenigen Stunden toleriert werden können. Dazu wurde STOX unter den zu erwartenden Elutionsbedingungen (verschiedene pH-Werte und Ionenstärken, chaotrope Ionen etc.) bei verschiedenen Temperaturen (4°C, 25°C) inkubiert und die Enzym-Aktivität von 50 µl Aliquots in kurzen Zeitabständen im optischen Standardtest gemessen. Als Vergleich diente in 50 mmol/l Kaliumphosphatpuffer gelöstes STOX. Die Ansätze, welche die Elutionsbedingungen simulierten, enthielten in 1 ml Gesamtvolumen 0.40 nkat STOX (Matrex Blue A-Eluat) mit 25 µmol

Kaliumphosphat-Puffer sowie alternativ: 50 μmol Natriumacetat (pH 3.0), 50 μmol Glycin (pH 3.0), 50 μmol Prolin (pH 3.0), 1.6 mmol MgCl_2 (pH 7.5), 4 mmol Harnstoff (pH 7.0), 0.5 mmol NaCl (pH 9.0), 1 mmol Glycin (pH 8.9), 10% Ethylenglykol (pH 8.9), oder 2.8 mmol Guanidinhydrochlorid (pH 7.0). Gegenüber sauren pH-Werten zeigte sich STOX äußerst empfindlich, so daß eine Elution über einen pH-Sprung nicht in Frage kam. Dissoziierende Agentien schädigten STOX ebenfalls äußerst schnell. So war nach bereits 7 Min. in Gegenwart von Harnstoff die STOX-Aktivität auf die Hälfte des Anfangswerts abgesunken, mit Guanidinhydrochlorid dauerte der Inaktivierungsprozeß keine 4 Min. Während eine hohe Ionenstärke an MgCl_2 (pH 7.5) nach bereits 20 Min. die Startaktivität halbiert hatte, Ethylenglykol nach 30 Min., zeigte sich STOX wesentlich stabiler in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen bei alkalischem pH-Wert (50% Inaktivierung nach 160 Min. bei 4°C). Gänzlich ohne negativen Einfluß auf die STOX-Aktivität war Glycin (1 mol/l pH 8.9). Das Repertoire zur Schwächung der Bindungskräfte zwischen STOX und seinem passenden Antikörper war damit recht eingeschränkt.

Zur Auswahl des geeignetsten Klons waren Antikörper über Mäuseaszites produziert und - wie in II. 7.2 beschrieben - gereinigt worden. Je 2 mg Antikörper jedes der 5 Klone wurden an 1 ml frisch gequollene und äquilibrierte CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Antikörper waren dabei in 2 ml Kopplungspuffer (0.1 mol/l Natriumcarbonat pH 8.7; 0.5 mol/l NaCl) gelöst. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur geschwenkt, das Gel abzentrifugiert und weitere 2 h mit 0.2 mol/l Glycin pH 8.0 zur Absättigung reaktiver Gruppen der Gelmatrix inkubiert. Aus den ungebundenen Proteinmengen der gesammelten Überstände konnten Kopplungsraten von 65 - 93% ermittelt werden. Zur Untersuchung der STOX-Bindung an die verschiedenen Gele wurden je 0.5 ml Gel zusammen mit jeweils gleichen Volumina an Phosphat-Puffer (50 mmol/l pH 7.4) und STOX (4.25 nkat; 0.7 mg Protein) 60 Min. geschwenkt, abzentrifugiert und die ungebundenen

Aktivitäts- und Proteinmengen im Überstand gemessen. Die geringste Aktivität (15% der eingesetzten) wurde im Überstand der Affinitätsmatrix mit dem Antikörper eines Klonns mit der Bezeichnung NS-1 gefunden. Die übrigen Werte lagen alle über 50%. Zur Affinitäts-chromatographischen STOX-Reinigung wurde dementsprechend eine große NS-1 Antikörpersäule präpariert. Aus 11 Aszitesentnahmen von 4 Mäusen wurden 31 mg Antikörper - wie beschrieben (II. 7.2) - gewonnen, gegen Kopplungspuffer dialysiert und bei Raumtemperatur 24 h mit CNBr-aktivierter Sepharose (erst unmittelbar vorher mit Kopplungspuffer äquilibriert) inkubiert. Pro mg Protein wurden 0.6 g lyophilisiertes Gel verwendet. Nach Blockierung freier Bindungsstellen (s.o.) wurde das Gel von möglicherweise überschüssig adsorbiertem Protein durch Waschen mit Acetatpuffer (0.1 mol/l pH 4; 0.5 mol/l NaCl) befreit und in Kaliumphosphat-Auflösungspuffer äquilibriert. Die Kopplungsrate betrug 96.3%.

Zur Affinitäts-chromatographischen STOX-Reinigung wurden 103 g tiefgefrorener Suspensionskulturzellen von Berberis wilsoniae var. subcaulialata im Standardverfahren aufgeschlossen (II. 5.2) und dann über eine XAD 2-Säule (1.96 cm² x 25 cm) von Alkaloiden befreit. Die STOX-haltige Präparation (295 ml) wurde 2 mal über die Antikörpersäule (1.54 cm² x 11.5 cm) gepumpt (9 ml/h) und die Säule mit dem 3-fachen Säulenvolumen Boratpuffer (0.1 mol/l pH 8.9) nachgewaschen. Die Elution mit 1 mol/l Glycin pH 8.9 erfolgte bei der gleichen Flußrate wie in Abbildung 14 dargestellt. Das Verfahren lieferte eine STOX-Präparation, welche gegenüber dem unbehandelten Rohextrakt 55-fach angereichert war. Das Enzym lag allerdings extrem verdünnt (35 µg/ml) in einer 1 mol/l-Lösung Glycin vor. Eine rasche, verlustfreie Konzentrierung erwies sich als schwierig. Ultrafiltration war mit fast quantitativen Verlusten verbunden, die Adsorption an einen Anionenaustauscher - wie sie erfolgreich in III. 2.3 ausgenützt worden war - war wegen des riesigen Überschusses an Glycinanionen nicht möglich. Zur Konzentrierung

wurde das Eluat schließlich in einem Dialyseschlauch einer Polyethylenglykollösung bei 4°C ca. 12 h ausgesetzt (50% w/v Polyethylenglykol 20 000, Sigma, in Glycin-/NaOH-Puffer 0.1 mol/l pH 8.9). Vorteil dieses Verfahrens ist, daß der Probe nicht nur Wasser, sondern auch die Elektrolyte entzogen werden, welche somit nicht aufkonzentriert werden. Die Prozeßdaten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Bei dem so gereinigten STOX handelte es sich noch keineswegs um ein reines Produkt, wie die denaturierende Gelelektrophorese

Reinigungs- stufe	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Gesamt- Protein (mg)	spezif. Aktivität (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Reini- gung (x-fach)
Rohextrakt	298	47.7	263.8	0.18	100	1
XAD 2-Filtrat	295	57.8	252.4	0.23	121	1.3
Affinitätssäule	70	24.8	2.5	9.92	52	55.1
PEG 20-Konzentrat	7	14.3	1.1	13.0	30	72.2

Tabelle 4 Affinitäts-chromatographische STOX-Reinigung mit monoklonalen Antikörpern, gekoppelt an Sepharose 4 B

zeigte (Abbildung 14). Die Wiederverwendbarkeit der Affinitätssäule war äußerst beschränkt. Wie Abbildung 15 zeigt, konnte bei wiederholter Durchführung des beschriebenen Affinitäts-chromatographischen Reinigungsverfahrens eine stetige Abnahme der präparierten STOX-Menge beobachtet werden. Intention für die Affinitäts-Chromatographie war es gewesen, die qualitativen und quantitativen Aspekte der

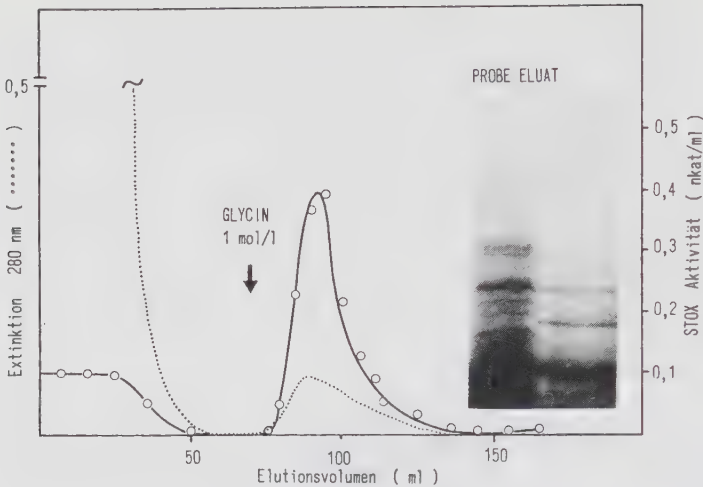


Abbildung 14 Immunaффinitätschromatographische Reinigung der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase. Affinitätsmatrix: Sepharose gekoppelte monoklonale Antikörper gegen die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (1.54 cm x 11.5 cm). Flußrate: 9 ml/h. Elutionsmittel: 1 mol/l Glycin pH 8.9. Das SDS-Polyacrylamidgel des Eluats zeigt noch mehrere Proteinbanden.

beiden vorgestellten Verfahren (III. 2.1-2.5 und 2.6) in einer Methode zu vereinigen. Diese Wunschvorstellung konnte in dieser Form nicht realisiert werden, da das Produkt nicht so sauber war wie dasjenige der ausführlichen konventionellen Reinigungsprozedur, der Zeitaufwand dabei sogar etwas größer war (4 Tage) und die erzielbaren Aktivitätsmengen bei der verwendeten Säulendimension für präparative Zwecke zu gering waren. Zur präparativen wie zur analytischen Gewinnung von STOX wurden daher die beiden zuvor beschriebenen Verfahren verwendet.

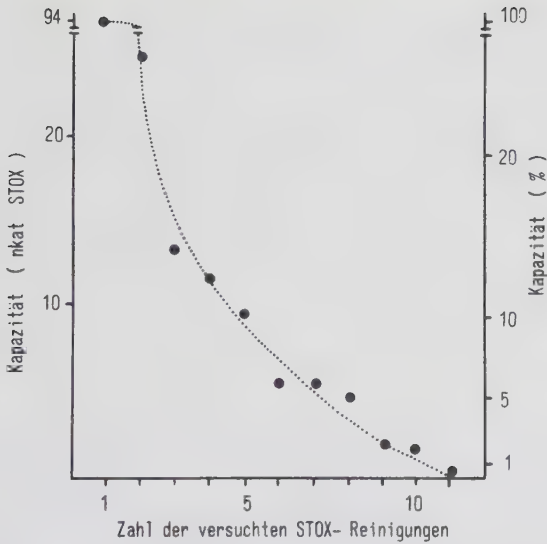


Abbildung 15 Verlust der Bindungskapazität der Immunaффinitätschromatographiesäule (Sephacrose 4B mit monoklonalen Antikörpern gegen STOX) bei wiederholten Enzymreinigungsversuchen.

3. Charakterisierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)

Während das Arbeiten mit angereicherten Enzympräparationen oft wertvolle Hinweise auf Enzym-Charakteristika geben kann, lassen sich manche Enzymparameter oft besser mit homogenem Ausgangsmaterial bestimmen. Zur Charakterisierung wurde daher ausschließlich elektrophoretisch gereinigte homogene oder von Fremdproteinen freie (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase verwendet.

3.1 Stereospezifität des Enzyms

Seit der epochalen Beobachtung der stereospezifischen Weinsäurefermentation durch Louis Pasteur (1858) wurde die Stereospezifität von Enzymen an Hunderten von Beispielen belegt. Stereospezifität gilt uns heute als ein wesentliches Kennzeichen enzymatischer Katalyse. Ausnahmen jedoch zeigen, daß eine Dogmatisierung auch hier unangebracht ist. So erfolgt in der Protoberberin-Biosynthesekette z.B. die N-Methylierung des Norretikulins stereounspezifisch, der Schluß der Berberinbrücke zum Tetrahydroprotoberberingerüst jedoch strikt spezifisch für das (S)-Enantiomer. Während diese Enzyme zu keiner Veränderung des chiralen Molekülzentrums führen, betrifft die STOX-katalysierte Reaktion unmittelbar das chirale C-14 des Tetrahydroprotoberberingerüsts bzw. C-1 der 1-Benzylisochinoline. Klare Hinweise auf eine absolut stereospezifische Oxidation lieferten die Umsätze der stereounspezifisch am chiralen Kohlenstoff Tritium markierten Substrate (R,S)-[1-³H]-Retikulin und (R,S)-[8,14-³H₂]-Scoulerin. Mehr als 50 bzw. 37.5% des Tritiums konnte aus den Substraten enzymatisch nicht ausgebaut werden (siehe Abbildung 8 und 9 in III. 1.4). Inkubiert man razemisches Tetrahydropalmatin (25.9 nmol) mit STOX (Ansatzvolumen 0.8 ml mit 75 pkat Enzym-Aktivität und 75 µmol Boratpuffer, pH 8.9), registriert die Extinktionszunahme bei 343 nm, bis ein konstanter Wert erreicht ist und zeichnet dann ein UV-Spektrum des Ansatzes auf, erhält man einen Kurvenverlauf, welcher sich durch Supposition äquimolarer Konzentrationen von Palmatin und

Tetrahydropalmatin erklären läßt. Die über den Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{343} = 31.6 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$) berechenbare Menge gebildeten Palmatins beträgt 13.2 nmol. Innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm 3\%$ werden also 50.9% des optisch inaktiven Substrats zu Palmatin oxidiert. Die Antwort, ob die (R)- oder (S)-Konfiguration im Substrat vorliegen muß, wurde im optischen Test mit reinen Enantiomeren klar zu Gunsten der (S)-Konfiguration entschieden. Nicht der geringste Umsatz wurde mit dem aus (R)-Norprotosinomenin synthetisierten Tetrahydroprotoberberin (II. 4.1), mit (R)-Coramin, (R)-Norretikulin und (R)-Retikulin erzielt. Neben den Evidenzen des ^3H -Ausbautests und der optischen Tests zeigten auch die radioimmunologischen Daten (III. 5.3) ganz eindeutig die absolute Spezifität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase für die (S)-Konfiguration, was im "(S)"-Präfix des Enzymnamens wiedergegeben wurde. Eindrucksvoll verbildlicht wurde die Stereospezifität darüber hinaus in Experimenten mit Saccharose-Dichtegradienten, welche jeweils das (R)- oder (S)-Enantiomer enthielten (Abbildung 42 in III. 4.3.2) sowie durch die stereospezifische cytochemische DAB-Oxidation (Abbildung 40 in III. 4.3.1).

3.2 Identifizierung der Enzymprodukte

Absolute Gewißheit über das molekulare Schicksal des Substrats gibt die Identifizierung und Charakterisierung der durch Enzym-Katalyse gebildeten Produkte. Da die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Verbindungen zweier verschiedener Substanzklassen als Substrate akzeptiert, soll stellvertretend aus jeder Gruppe ein Produktvertreter ausführlich besprochen werden. BATTERSBY et al. hatten 1965 mit der Oxidation von (S)-Retikulin einen frühen Schritt in der Morphin-Biosynthese postuliert. Weit besser als (S)-Retikulin oxidiert STOX das N-Nor-Derivat. 1,2-Dehydronorretikulin soll als Vertreter der enzymatisch katalysierten Oxidationsprodukte aus der Gruppe der 1-Benzylisochinoline beschrieben werden. Bei der 2. Gruppe der STOX oxidierbaren Substrate handelt es sich um die Tetrahydroprotoberberine.

Eine Arbeitsgruppe in Connecticut, USA, äußerte Zweifel, ob das Tetrahydroprotoberberin Tetrahydrojatrorrhizin von STOX überhaupt oxidiert werden könne (BEECHER und KELLEHER, 1984). Das enzymatische Oxidationsprodukt von Tetrahydrojatrorrhizin (= Corypalmin) soll daher die Produktgruppe der Protoberberine vertreten.

Zu Gewinnung des Oxidationsprodukts von (S)-Norretikulin wurden 8.6 μmol (S)-Norretikulin in einem 10 ml Ansatz (1 mmol Boratpuffer, pH 8.9) mit 6.2 nkat gereinigtem STOX 24 h lang bei 25°C inkubiert. Die dann stark gelb verfärbte Lösung wurde mit Essigester extrahiert und die organische Phase Dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt. Es zeigte sich im Laufmittel 1 (II. 14) eine gelbe Bande (R_f 0.1), welche unter UV-Licht (366 nm) orange fluoreszierte. Im sauren Laufmittel 2 zeigte sich eine blau fluoreszierende Bande bei einem R_f von 0.6. Zugabe von NaBH_4 entfärbte die Produktlösung sehr schnell. Das reduzierte Produkt cochromatographierte mit Norretikulin. Zur spektroskopischen Untersuchung wurde authentisches 1,2-Dehydronorretikulin als Referenzsubstanz durch Debenzylierung aus O,O-Dibenzyl-Dehydronorretikulin gewonnen (60 Min. in HCl konz. kochen). Das UV-Spektrum (Abbildung 6 in III. 1.1) des enzymatischen Produkts wie auch das der Referenzsubstanz zeigte bei Ansäuern die gleiche hypsochrome Verschiebung. Nach BH_4^- -Reduktion erhielt man in beiden Fällen das typische Norretikulinspektrum (λ_{max} 282 nm, λ_{min} 257 nm). Generell erwies sich diese Vorgehensweise, die Analyse von oxidiertem und reduziertem Produkt, für alle spektroskopischen und chromatographischen Nachweise als äußerst aussagekräftig. Am Beispiel des enzymatisch gebildeten 1,2-Dehydronorretikulins wird dies überzeugend demonstriert. Das Molekulargewicht von Norretikulin beträgt 315. Mißt man unter den Bedingungen der chemischen Ionisation (Isobutan) ein Massenspektrum des enzymatischen Oxidationsprodukts, erhält man als Hauptfragment ein Molekülion mit der Masse 314. Eine Derivatisierung der Hydroxylgruppen (CASHEW et al., 1984) war nicht nötig. Da über eine Ionisierung des Reaktandgases das Molekül bei dieser Technik

protoniert, also um eine Masseneinheit vergrößert wird, beträgt das tatsächliche Molekulargewicht der Verbindung 313. Ein deckungsgleiches Spektrum erhielt man mit authentischem 1,2-Dehydronorretikulin. Das EI-Massenspektrum (Elektronenstoßionisation) bestätigte dieses Molekulargewicht: EI-MS m/z (rel. Int.%): 313 (M^+ 47), 178 (100), 163 (27). Die massenspektroskopische Fragmentation des mit NaBD_4 in Methanol reduzierten Enzymprodukts zeigte den Einbau von einem Deuteriumatom, welches sich in dem für Benzylisochinoline typischen (OHASHI et al., 1963) Isochinolinfragment 179 befindet. Zu der chromatographischen und spektroskopischen Evidenz hinzu kommt die hohe Aussagekraft des radioimmunologischen Nachweises. Während 1,2-Dehydronorretikulin keine Kreuzreaktion in dem von WIECZOREK (1984) aufgebauten Test zeigt, ließen sich im Reduktionsprodukt (R)- und (S)-Norretikulin radioimmunologisch nachweisen. Die Daten belegen damit zweifelsfrei, daß es sich bei dem durch STOX gebildeten Oxidationsprodukt von (S)-Norretikulin um 1,2-Dehydronorretikulin handelt.

Das Protoberberin Jatrorrhizin stand in größerer Menge als Referenzsubstanz zur Verfügung. Es ist das Hauptalkaloid der untersuchten Berberis Zellkultur. Sein Reduktionsprodukt (R,S)-Tetrahydrojatrorrhizin wurde über NaBH_4 -Reduktion, wie beschrieben (II. 4.1), hergestellt. Nach STOX-katalysierter enzymatischer Oxidation wurde das Produkt aus einem Ansatz extrahiert, welcher 24 h bei Raumtemperatur gestanden hatte. Er enthielt in 80 ml Gesamtvolumen 5 nkat STOX und $58.6 \mu\text{mol}$ in wenig Methanol gelöstem (R,S)-Tetrahydrojatrorrhizin bei einem Borat-gepufferten pH von 8.0. Dünnschichtchromatographische Analyse in Laufmittel 6 (vgl. II. 14) zeigte Jatrorrhizin sowie eine weitere Bande, welche den gleichen R_f -Wert (0.4) wie Tetrahydrojatrorrhizin aufwies und sich wohl aus dem nicht umgesetzten (R)-Enantiomer sowie aus dem aus der Lösung nachträglich ausgefallenen Tetrahydrojatrorrhizin zusammensetzte (Tetrahydroprotoberberine lösen sich äußerst schlecht in alkalischem, wässrigem Milieu). Auch in Fließmittelsystem 7 konnten 2 gleich starke Banden identi-

fiziert werden (Tetrahydrojatrorrhizin Rf 0.9, Jatrorrhizin Rf 0.4). Das enzymatisch gebildete Produkt wurde eluiert und nach Reduktion mit NaBH_4 in verschiedenen Laufmitteln rechromatographiert. Das entfärbte Produkt war chromatographisch wieder identisch mit Tetrahydrojatrorrhizin. Das UV-Spektrum des reduzierten Produkts entsprach dem von Tetrahydrojatrorrhizin (λ_{max} 281.5 nm), das des oxidierten Produkts dem von Jatrorrhizin. Es zeigte die gleichen Verschiebungen, wie sie für Jatrorrhizin beim Übergang in alkalisches Medium beobachtet wurden. UV (Phosphat-Puffer 0.1 mol/l, pH 7.0) λ_{max} (nm) 420, 341, 272, 224; UV (Borat/HCl 0.1 mol/l pH 8.8) λ_{max} (nm) 444, 369, 241. Zur massenspektroskopischen Analyse eignen sich die quaternären Protoberberine nur schlecht. Sie zeigen üblicherweise eine große Zahl wenig charakteristischer Fragmente. Gut auswertbar hingegen sind die Spektren der reduzierten Tetrahydroprotoberberine (CHEN und MacLEAN, 1968). Die Reduktion des Enzymprodukts erfolgte in Methanol und d_4 -Methanol mit NaBH_4 oder NaBD_4 . Die Fragmentationsanalyse geht aus Abbildung 16 hervor. Im ^1H -Kernresonanzspektrum ließen sich die Signale (ppm) wie folgt zuordnen (bezügl. Tetramethylsilan): 10,15 (s, OH, austauschbar mit D_2O), 9,96 (s, H-13), 9,87 (s, H-8), 8,198 und 8,032 (2d, 9.2 Hz, H-11, H-12), 7,696 und 6,88 (2s, H-1, H-4), 4,903 (t, 2H-6), 4,097, 4,069 und 3,948 (3s, 3 OCH_3), 3,152 (t, 2H-5). Chromatographisch und spektroskopisch konnte damit zweifelsfrei das STOX-katalysierte enzymatische Oxidationsprodukt von Tetrahydrojatrorrhizin als Jatrorrhizin identifiziert werden.

3.3 Stöchiometrie der enzymatischen Oxidationsreaktion

Oxidation bedeutet für ein Molekül den Entzug von Elektronen. Möglich ist dies nur, wenn ein zweites Substrat gleichzeitig als Akzeptor fungiert und reduziert wird. Zwei Möglichkeiten sind in der Biochemie häufig verwirklicht. Entweder ein direkter Wasserstofftransfer auf oxidierte Pyridinnukleotide, oder die Verwendung von molekularem Sauerstoff unter dessen

164 149 176 341	165 150 177 343	166 151 177 344
NaBH₄ Methanol	NaBD₄ Methanol	NaBD₄ d₄-Methanol

Abbildung 16 Massenspektroskopische Analyse des STOX-Enzymprodukts aus Tetrahydrojatrorrhizin nach Reduktion (NaBH₄), (NaBD₄) in verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, d₄-Methanol). Massenspektroskopische Fragmente sind als m/e (rel. Int.%) angegeben.

Reduktion zum Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Wasser. Inkubation von gereinigtem STOX in optischen Standardansätzen in Gegenwart von je 150 nmol Pyridinnukleotiden (NAD, NADP) zeigte gegenüber Kontrollansätzen keine Beeinflussung der Umsatzrate oder des Reaktionsendpunkts. Auch die Quantifizierung der Extinktionsänderung ergab keinen Hinweis auf eine begleitende Pyridinnukleotid-Reduktion. Qualitative Vorversuche legten hingegen nahe, daß Sauerstoff das gesuchte Cosubstrat sei. Zur Bestimmung der molaren Relation von O_2 -Verbrauch und Produktbildung wurde in vergleichbaren Ansätzen bei jeweils 30°C zum einen photometrisch die Produktbildung quantifiziert, zum anderen in einer Clark'schen Sauerstoffelektrode (vgl. II. 11) die Abnahme der O_2 -Konzentration des Ansatzes registriert (siehe Abbildung 17 und 18). Die gegen O_2 -Nachdiffusion verschlossenen Ansätze enthielten in 1.5 ml Borat-gepufferter Lösung 0.54 μmol (S)-Scoulerin bzw. 0.82 μmol (S)-Norretikulin und 0.1 - 0.5 nkat STOX bei einem pH von 8.9. Mit dem Tetrahydroprotoberberin (S)-Scoulerin als Substrat ergab sich als Mittelwert von 7 Versuchen ein O_2 /Produkt-Quotient von 1.54. Für (S)-Norretikulin als Substrat wurde ein Verhältnis von 1.03 bestimmt.

Zugabe von Katalase (100 U) zu den Ansätzen führte in allen Fällen zu einer augenblicklichen Erhöhung der O_2 -Konzentration, welche sich einfach aus der katalytischen Freisetzung von O_2 aus H_2O_2 erklärt. Die strikte O_2 -Abhängigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion, welche in Abwesenheit löslicher Redox-Cofaktoren erfolgt und die Katalase-bedingte O_2 -Zunahme weisen deutlich auf Wasserstoffperoxid als Coprodukt der STOX-Katalyse hin. Die Bildung von H_2O_2 läßt sich quantitativ nur in völliger Abwesenheit von Katalase bestimmen. Zur Gewinnung absolut Katalase-freier STOX-Präparationen wurde daher im letzten Schritt der Enzym-Reinigung (präparative Gelelektrophorese, vgl. III. 2.4) auch Katalase in situ nachgewiesen, um mögliche Verunreinigungen des STOX-Präparates auszuschließen. Die Katalase konnte

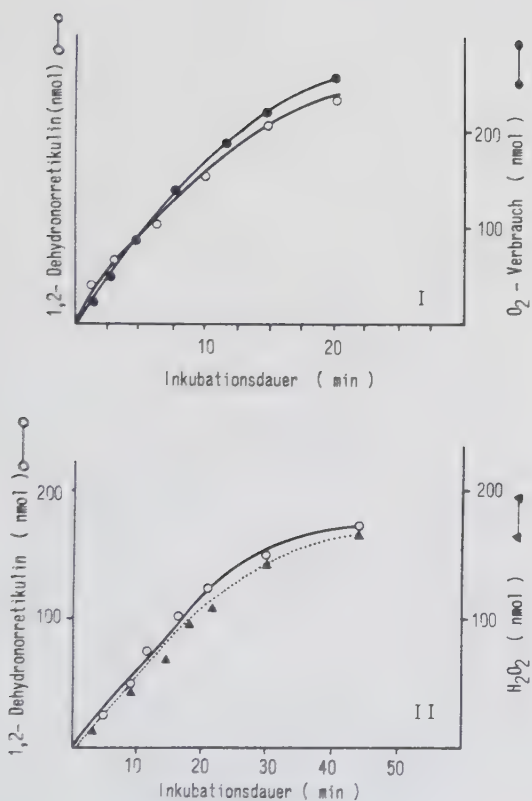


Abbildung 17

Bestimmung der Stöchiometrie der STOX-katalysierten Reaktion für das 1-Benzylisochinolin (S)-Norretikulín.

I. Kinetische Messung des Sauerstoffverbrauchs (O_2 -Elektrode) und der Bildung von 1,2-Dehydronorretikulín im optischen Test.

II. Kinetische Messung der H_2O_2 -Bildung (Peroxidase-gekoppelter Farbtest) und der Produktbildung in Ansätzen mit (S)-Norretikulín.

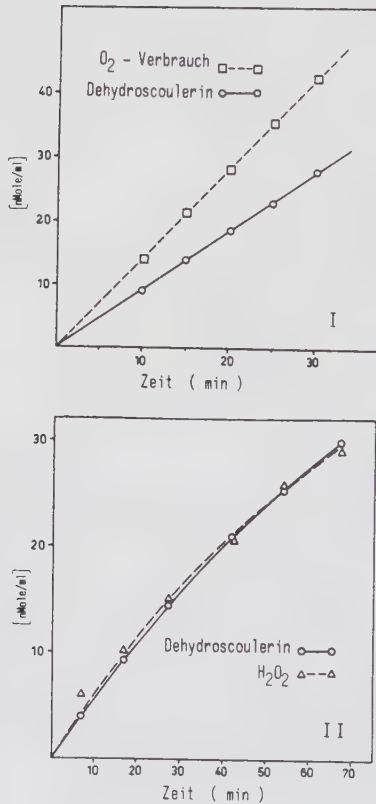


Abbildung 18

Bestimmung der Stöchiometrie der STOX-katalysierten Reaktion für das Tetrahydroprotoberberin (S)-Scoulerin.
I. Kinetische Messung des Sauerstoffverbrauchs (O_2 -Elektrode) und der Bildung von Dehydroscoulerin im optischen Test.
II. Kinetische Messung der H_2O_2 -Bildung (Peroxydase-gekoppelter Farbttest und der Produktbildung in Ansätzen mit (S)-Scoulerin.

durch Inkubation des Polyacrylamidgels in 0.5%iger H_2O_2 -Lösung durch die Bläschenbildung im Gel leicht lokalisiert werden. Zusätzlich wurde die STOX-Präparation im photometrischen Test auf Katalase Abwesenheit überprüft (II. 6.2). Nach Ausarbeitung einer störungsfreien Nachweismethode konnte die Bildung von H_2O_2 in Ansätzen mit verschiedenen Substraten kinetisch verfolgt werden (Abbildung 17 und 18). Die 1.5 ml Ansätze enthielten 145 μmol Borat-Puffer pH 8.9, 393 nmol (S)-Scoulerin (bzw. 315 nmol S-Norretikulin, 312 nmol (S)-Coreximin, 113 nmol (R,S)-Corypalmin) und elektrophoretisch einheitliches STOX. Die Extinktionszunahme wurde photometrisch verfolgt, die H_2O_2 -Bildung durch Entnahme von aliquoten Teilen desselben Ansatzes im Peroxidase-gekoppelten Test (vgl. II. 12) bestimmt. Je nach Substrat wurde der Fluoreszenztest oder der Phenol /Antipyrin-Test eingesetzt. (Fluoreszenztest: Coreximin, Scoulerin; Phenol /Antipyrin-Test: Corypalmin, Norretikulin). Für alle getesteten Substrate ergab sich ein strikt äquimolares Verhältnis von 1 : 1 von gebildetem Produkt und H_2O_2 . Bestätigt wurden die gefundenen molaren Verhältnisse durch eine präzise Vermessung der Sauerstoff Verbrauchsrate in Gegenwart und Abwesenheit von Katalase. Setzt man den vor Katalase Zugabe gemessenen Wert als 100 an, beträgt die Sauerstoffzehrung in Gegenwart von Katalase (Differenz aus STOX O_2 -Verbrauch und Katalase O_2 -Generation) mit (S)-Norretikulin 48%, mit (S)-Scoulerin im Mittel 67.3%. Die Abnahme der O_2 -Konzentration in Gegenwart und Abwesenheit von Katalase ist ein direktes Maß für die stöchiometrische Beziehung zwischen O_2 -Verbrauch und H_2O_2 -Entstehung. Die theoretisch zu erwartenden Werte bei einem O_2 / H_2O_2 -Verhältnis von 2 betragen 75%, von 1.5 66.7% und von 1 50%. Die gefundene H_2O_2 -Stöchiometrie entspricht also exakt dem vorhersagbaren Wert. Während die vorgestellten Daten zur Stöchiometrie der (S)-Norretikulin Oxidation vollständig sind, ergibt sich im Fall der (S)-Tetrahydroprotoberberine, daß die Bilanz durch ein Wassermolekül vervollständigt werden muß. Dies ergibt sich daraus, daß die enzymatisch gebildete instabile Iminium-

form des Tetrahydroprotoberberins (vgl. nachfolgendes Kapitel III. 3.4) unter Sauerstoffverbrauch und der Bildung von H_2O zum Protoberberin oxidiert. Aus den Experimenten zur Klärung der Stöchiometrie ergibt sich das in Abbildung 19 zusammengefaßte Bild.

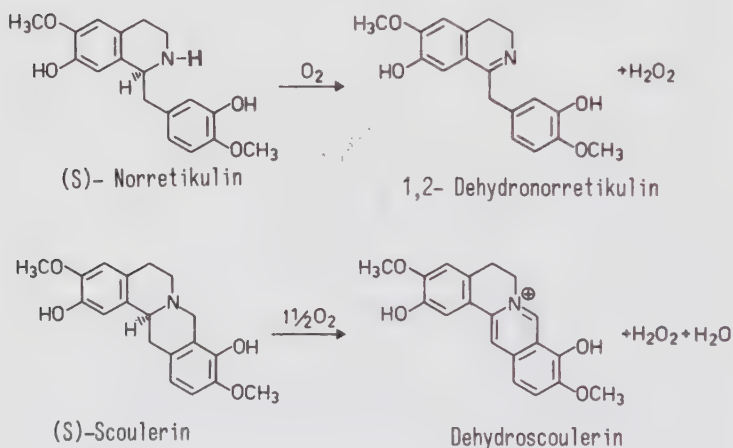


Abbildung 19 Stöchiometrie der STOX-katalysierten Oxidation von 1-Benzylisochinolin zu 1,2-Dehydrobenzylisochinolin und von (S)-Tetrahydroprotoberberinen zu Protoberberinen, dargestellt am Beispiel von (S)-Norretikulin und (S)-Scoulerin.

3.4 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

Während die enzymatische Oxidation der 1-Benzylisochinoline mit der Ausbildung einer Iminstruktur im Isochinolinteil verbunden ist, verläuft die Oxidation der Tetrahydroprotoberberine formal über den Einzug zweier Doppelbindungen, was zur Aromatisierung des C-Rings führt und damit zur Schaffung des durchkonjugierten Protoberberin Elektronensystems. Da

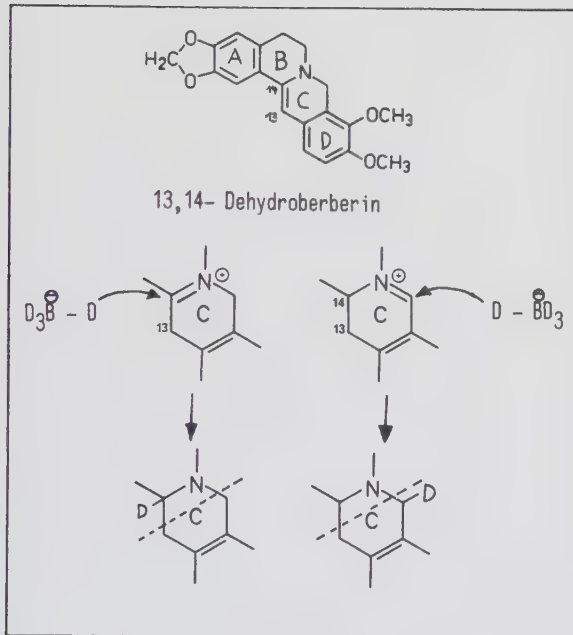


Abbildung 20 Untersuchungen zur Natur des Zwischenprodukts der enzymatischen (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidation.
Oben: Das 13,14-Dehydroberberin ist weder Intermediat noch Substrat der STOX-katalysierten Reaktion.
Mitte: Prinzip der Abfangreaktion eines Iminiumintermediats unter Einführung eines schweren Wasserstoffisotops in das Tetrahydroprotoberberingerüst.
Unten: Massenspektroskopische Fragmentierung des Tetrahydroprotoberberingerüsts, welche die Lokalisierung des Deuteriums am C-14 im Isochinolinfragment zweifelsfrei gestattet.

biologische Oxidationen in der Regel in Schritten von einem oder zwei Elektronen verlaufen, stellte sich die Frage, an welcher Stelle im Tetrahydroprotoberberin-Ringsystem die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase primär angreift. In Frage kommen die Kohlenstoffbindungen 13 - 14 wie auch die beiden C-N-Bindungen im Ring C. Da die Iminstrukturen unter enzymatischen Testbedingungen (O_2 -Anwesenheit, alkalischer pH) nicht stabil sind (MEISE, 1971), wurde zuerst der mögliche intermediäre Charakter der 13,14-Dehydroverbindung untersucht. Als dafür geeignetstes Substrat erschien das System aus Tetrahydroberberin (= Canadin), 13,14-Dehydroberberin (evtl. intermediäre Enaminstruktur, Abbildung 20) und Berberin, da eine Synthese der Dehydroform beschrieben war (II. 4.2) und Oxidation zum Berberin leicht über dessen Fluoreszenz (III. 1.5) erkannt werden konnte. Daß es sich bei 13,14-Dehydroberberin (Abbildung 20) nicht um ein besonders instabiles Molekül handelt, zeigte der qualitative Vergleich seiner Autoxidationsneigung mit der von Canadin. Gleich konzentrierte Lösungen beider Substanzen wurden bei 25° und 100°C in wässriger Lösung und auf verschiedenen Trägermaterialien (Whatman 3 M, Kieselgel- und Aluminiumoxid-Dünnschichtfolien) inkubiert und hinsichtlich Berberinbildung chromatographisch ausgewertet (II. 14, Laufmittel 4: 13,14-Dehydroberberin Rf 0.3, Berberin Rf 0.5, Canadin Rf 0.9). Canadin erwies sich in allen Ansätzen als wesentlich leichter autoxidabel als 13,14-Dehydroberberin. Blieb noch die Frage, ob 13,14-Dehydroberberin sich auf enzymatischem Wege zu Berberin oxidieren lassen würde. Von Enzymansätzen mit 13,14-Dehydroberberin (1.1 ml; 9.4 pkat STOX, Borat-gepuffert, pH 8.9) wurden dazu kinetisch UV-Spektren aufgenommen sowie aliquote Teile zur Dünnschicht-chromatographischen Analyse entnommen und mit Enzym-freien Kontrollansätzen verglichen. Die Auswertung der Spektren zeigte keine Veränderungen oder Intensitätsverschiebungen der Absorptionsmaxima (Quotienten - nm - 262/344, 262/420, 344/420 konstant). Dünnschicht-chromatographisch konnte Berberin erst ab dem Zeitpunkt nachgewiesen werden, zu dem dem Ansatz eine Mikro-

spatelspitze NaBH_4 zugegeben worden war. Das 13,14-Dehydroberberin wurde dabei zu Canadin reduziert, welches von STOX zu Berberin oxidiert werden konnte. Eine Oxidation des Canadins über sein Enamin zum Berberin erschien damit unwahrscheinlich.

Zwei Iminiumformen des B / C-Chinolizidinsystems sind zur Oxidation des C-Rings denkbar (Abbildung 20). Aufgrund der oben erwähnten Instabilität der Iminium-Verbindung läßt sich eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten nur über ein Experiment herbeiführen, bei welchem ein intermediäres Iminium-Ion charakteristisch markiert werden kann. Der gezielte Einbau eines schweren Isotops und seine spektroskopische Lokalisation stellten hierfür eine geeignete Strategie dar. Die möglicherweise bei der enzymatischen Oxidation von (S)-Scoulerin auftretende Iminiumform sollte, noch bevor das Elektronensystem zum Protoberberin durchkonjugiert, durch NaBD_4 zum Scoulerin rückreduziert werden. Auf diese Weise würde sich Deuterium in Position 14 oder 8 anreichern lassen. Die charakteristische retro-Diels-Alder-Öffnung von Ring C bei der elektronischen Ionisation im Massenspektrometer sollte es dann massenspektroskopisch erlauben, aus dem Vergleich mit den spektroskopischen Daten nichtdeuterierten Scoulerins eindeutig auf die Lage des Deuteriums und damit der intermediären Iminbindung rückzuschließen (Abbildung 20). Die Bezeichnung der Fragmente (a, b, c, d) erfolgt in Anlehnung an CHEN und MacLEAN (1968). Durchgeführt wurde dieses Experiment mit einem Enzymsatz, welcher in einem Gesamtvolumen von 1.5 ml 0.88 μmol (S)-Scoulerin (in 75 μl Methanol), 100 μmol Borat-Puffer, pH 8.9, 23 μmol NaBD_4 und 0.6 nkat STOX enthielt. In halbstündigen Abständen wurden jeweils 0.5 mg NaBD_4 zugegeben. Über die gesamte Inkubationsdauer von 3 h konnte photometrisch keine Extinktionszunahme gemessen werden, was auf das erwünschte Unterbleiben der Scoulerin Oxidation hinwies. Der Ansatz sowie ein vergleichbarer Kontrollansatz (BH_4^- statt BD_4^-) wurde erschöpfend mit Chloroform extrahiert und das Scoulerin Dünnschicht-chromatographisch (Laufmittel 6, vgl. II.14)

gereinigt und massenspektroskopisch analysiert. Ersatz eines Wasserstoffs durch Deuterium ist mit einer Erhöhung der Masse um eine Einheit verbunden. Substanzen, wie Scoulerin, welche neben dem Molekül-Ion noch über ein ausgeprägtes $M^+ - 1$ Fragment verfügen, müssen daher bei der Auswertung der M^+ -Verschiebung durch Deuteriumeinbau kritisch analysiert werden. Das Molekül-Ion zeigte eine Verschiebung um eine Masseneinheit von 327 auf 328. Unproblematischer und wesentlich aussagekräftiger ist die Auswertung der Massenverschiebung verschiedener Fragmente, da sie eine Lokalisation des schweren Isotops erlaubt. Für alle Berechnungen der Deuteriumgehalte wurde das von BIEMANN (1962) angegebene Rechenverfahren benutzt, welches die Fragmentintensitäten um die Anteile benachbarter Intensitäten korrigiert. Die Daten wurden aus 7 Spektren im gleichen Temperatur-Intervall gemittelt. Die Deuteriumgehalte (Prozentangaben in Klammer) der charakteristischen Fragmente betrugen $M^+ 328$ (48), Isochinolinfragment a 179 (54) und Fragment c 151 (< 3).

Das gesamte Deuterium konnte also im Isochinolinfragment wiedergefunden werden. Mit 0.22 μmol Tetrahydrojatrorrhizin durchgeführt, ergab dasselbe Experiment ebenfalls nur eine Massenerhöhung des Isochinolinfragments (Ion b) auf 177 und keine Veränderung von Fragment 164 (Ion c). Die Deuteriumeinbau-Experimente zeigen deutlich, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase das Tetrahydroprotoberberin-Gerüst zunächst unter Ausbildung der C-14 - N-7 Doppelbindung oxidiert, was genau derselben Stelle im Fall des 1-Benzylisochinolin-Gerüsts entspricht. Zur weiteren und damit vollständigen Aromatisierung zum Protoberberin muß eine enzymatische Reaktion nicht notwendigerweise vorausgesetzt werden, da das Imin sehr schnell und spontan in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert (MEISE, 1971). Unter der Beachtung der gefundenen Stöchiometrie (III. 3.3) läßt sich die Oxidation von (S)-Tetrahydroprotoberberinen also wie in Abbildung 21 dargestellt, formulieren.

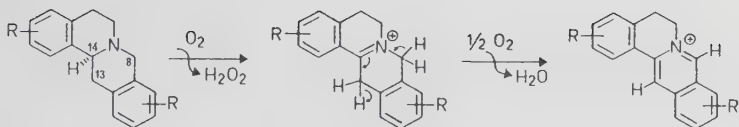


Abbildung 21 Gesamtreaktionsgleichung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysierten Oxidation von (S)-Tetrahydroprotoberberinen. Als Zwischenprodukt konnte die angegebene 7,14-Iminiumverbindung wahrscheinlich gemacht werden.

3.5 Identifizierung des Coenzyms

Die Aufklärung der von STOX enzymatisch katalysierten Reaktion (III. 3.3) hatte die stöchiometrische Beteiligung von Sauerstoff und Wasserstoffperoxid gezeigt. Nachdem Pyridinnukleotide keine unmittelbaren Elektronen-Überträger bei der O_2 -Reduktion sind, erschien die Beteiligung eines Flavins als plausibelste Annahme. Hinzu kam die Beobachtung, daß das schwach gelb erscheinende STOX bei genügender Konzentration in Polyacrylamidgelen bei Betrachtung unter einer UV-Lampe (366 nm) über seine gelbgrüne Eigenfluoreszenz lokalisiert werden kann (vgl. III. 2.4), welche sich durch Inkubation des Gels in 7% Essigsäure verstärken läßt. Neben diesem typischen Flavoprotein-Charakteristikum, welches sich in der historischen Flavoenzym-Nomenklatur in Gestalt des "Old Yellow Enzyme" erhalten hat, zeigt STOX in Gegenwart von Substrat eine typische orange Fluoreszenz, wie sie charakteristisch für viele Flavoenzyme ist (LEHNINGER, 1977). Zur näheren Charakterisierung dieses Phänomens wurden stark fluoreszierende Ansätze (Volumen 600 μl mit 50 μmol Boratpuffer, 285 nmol S-Norretikulin und 33 pkat STOX, pH 8.9)

durch Zugabe unterschiedlicher Reagenzien auf die Veränderung der Fluoreszenz hin untersucht. Denkbar war, daß die Fluoreszenz eine Eigenschaft des Enzymprodukts oder seiner Wechselwirkung mit H_2O_2 war und keine genuine Eigenschaft des STOX-Proteins. Die Zugabe von $NaBH_4$ entfärbte zwar den Enzymansatz durch Reduktion des gefärbten 1,2-Dehydronorretikulins zu Norretikulin, doch ließ sie die Fluoreszenz unverändert. Das Enzym-Produkt als selbst fluoreszierende Verbindung konnte damit ausgeschlossen werden. Zupipettieren von Katalase zeigte keine Veränderung und auch die Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration im Ansatz bzw. einem entsprechenden Substrat-freien Ansatz, führte zu keiner Verstärkung der Fluoreszenz. Weder durch Wechselwirkung mit dem Substrat/Produkt noch mit dem Enzym allein scheint also H_2O_2 für die beobachtete Fluoreszenz nötig zu sein. Durch Quervernetzung des STOX-Proteins mit Glutardialdehyd, Zugabe von Mercaptoäthanol, 1,10-Phenanthrolin, $Na_2S_2O_5$ oder KJ konnte keine Veränderung der Fluoreszenz erreicht werden. Säuert man hingegen den Ansatz an, kann man die Fluoreszenz völlig zum Verschwinden bringen. Rücktitration zum alkalischen AusgangspH-Wert läßt auch die Fluoreszenz wieder sichtbar werden. Ist alles Substrat im Ansatz enzymatisch oxidiert, kann man die Fluoreszenz nicht mehr beobachten. Dies legt nahe, daß die Fluoreszenz strikt mit der katalytischen Aktivität des Enzyms gekoppelt ist. Sollte tatsächlich eine im katalytischen Zyklus oxidierte und reduzierte Flavingruppe an der Fluoreszenz beteiligt sein, müßte sich die Fluoreszenz dadurch verhindern lassen, daß man den Flavin-Redox-Zyklus im reduzierten oder oxidierten Zustand "einfriert". Oxidation des Ansatzes mit Ferricyanid bzw. Reduktion mit Dithionit führten tatsächlich zum Verschwinden der orangen Fluoreszenz.

Ein klarer Beweis für das Vorliegen eines Flavoenzyms läßt sich in der Regel einfach dadurch führen, daß man ein UV-Absorptionsspektrum und ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum des sauberen Proteins aufnimmt. UV-Spektren zeigen normalerweise zwei charakteristische Maxima (je nach Einfluß des Apoenzyms bei etwa 370 und 450 nm), Fluoreszenz-Emissionsspektren zeigen typischerweise ein Emissionsmaximum bei ca. 530 nm bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm (WALSH, 1979; UDENFRIED, 1962). Abbildung 22 zeigt die Spektren von elektrophoretisch sauberem STOX in Kaliumphosphat-Puffer pH 7.6 (1.15 mg/ml Protein). Das UV-Spektrum zeigt keine typische Flavinabsorption, das Fluoreszenzspektrum hingegen spricht eindeutig für das Vorliegen eines Flavoenzyms. Flavoenzyme enthalten 2 Typen von Coenzymen, FAD oder FMN. Von den Pyridin-abhängigen Enzymen unterscheiden sie sich unter anderem dadurch, daß das Flavinnukleotid eher in Form einer prosthetischen Gruppe fest am Apoprotein gebunden ist und es auch während des katalytischen Zyklus nicht verläßt. Soweit das Flavin nicht kovalent mit der Peptidkette verbunden ist, wie man es überwiegend bei FAD häufig gefunden hat (DECKER, 1981), läßt sich unter mehr oder minder drastischen Bedingungen (Wärme, Fällung, enzymatische Verdauung, Hydrolyse) das Flavin-Coenzym vom Protein abdissoziieren. Zur Identifizierung des Cofaktors wurde daher die STOX /Flavin-Dissoziation unter verschiedenen Bedingungen versucht und das erhaltene Material je nach Versuch mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Mit dem zum Dünnschicht-chromatographischen Flavinnachweis verwendeten Laufmittel 9 konnte Riboflavin von FMN/FAD, welches am Start liegen blieb, abgetrennt werden, eine Trennung von FAD und FMN war mit Fließmittel 10 und 11 möglich (vgl. II. 14). Zur Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wurde das von NIELSEN et al. (1983) angegebene System verwendet, wobei Flavin-spezifisch bei 448 nm detektiert wurde. Die fluorimetrische Flavinbestimmung erfolgte bei 530 nm in neutralem Kaliumphosphat-gepuffertem Milieu (50 mmol/l, pH 7.4) bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm. Pro ml

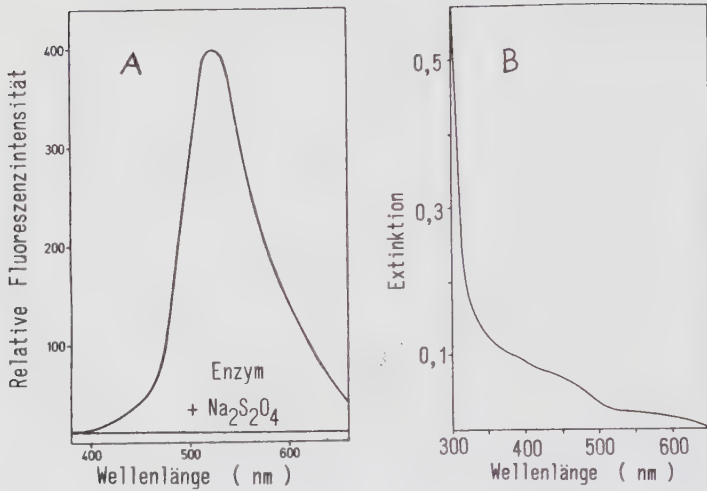


Abbildung 22 (A) Fluoreszenzemissionsspektrum von STOX in Kaliumphosphat-Puffer (50 mmol/l pH 7.6). Die Fluoreszenz läßt sich - wie dargestellt - durch Dithionitzugabe löschen.

(B) UV-Absorptionsspektrum der gereinigten (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (1.15 mg/ml) in Kaliumphosphat-Puffer (50 mmol/l pH 7.6).

konnte noch 0.2 nmol FAD/FMN sicher nachgewiesen werden, was gegenüber der photometrischen Bestimmung bei 450 nm eine 10-fache Steigerung der Nachweisempfindlichkeit bedeutete. Der mikrobiologische Flavinnachweis mit Lactobacillus casei erfolgte nach der bewährten Methode von HORWITZ (1975) über die Flavin-abhängige Wachstumsdichte der Mikroorganismen bei 620 nm. Die Nachweisgrenze lag bei 40 pmol Flavin. Da die Techniken zur Abdissoziation des Flavins oft mit beträchtlichen Verdünnungen einhergingen, wurden die Proben zum Teil an verschiedene Adsorber (Florisil, XAD 2 0.8-1 mm,

Dowex 1X4 100-200 mesh) gebunden und wieder eluiert. Alle Flavinpräparationen wurden lichtgeschützt durchgeführt. Das klassische Verfahren zur Flavinfreisetzung über eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) (BESSEY et al., 1949) wurde mit 720 µg sauberem STOX (7.2 nmol) unter Eiskühlung durch Zugabe eines gleichen Volumenteils (630 µl) 20% TCA durchgeführt. Im neutralisierten Überstand (Zugabe von 25% v/v 4 mol/l K_2HPO_4) ließen sich fluorimetrisch nur 0.2 nmol Flavin nachweisen, was weniger als 3% der erwarteten Menge entsprach. Dünnschicht-Chromatographie des Lyophilisats in Laufmittel 9 und 11 (vgl. II. 14) zeigte kein Flavin. Wiederholung des Ansatzes mit zusätzlichem Hitzeschritt (20 Min. 95°C), wie es erfolgreich zur Coenzym-Charakterisierung der Sarcosin Oxidase durchgeführt worden war (HAYASHI et al., 1980), brachte das gleiche negative Ergebnis. Einfache Hitzedenaturierung von STOX mit anschließender HPLC-Auftrennung des Überstands zeigte keine bei 448 nm absorbierende Substanz. Kochen von 820 µg Fremdprotein-freiem STOX, Abzentrifugieren und Gefriertrocknen des Überstands ergaben ein bräunliches, äußerst schwach fluoreszierendes Produkt, welches kein Dünnschicht-chromatographisch oder über HPLC nachweisbares Flavin enthielt. Nach TCA-Fällung des Gesamtansatzes (incl. koagulierte Protein) wurde der abzentrifugierte Überstand nach Neutralisation auf eine gewaschene (10% Aceton, 5% Pyridin, H_2O) Florisilsäule ($0.063\text{ cm}^2 \times 3.5\text{ cm}$) aufgegeben und 10 h im Kreis gepumpt (0.2 ml/Min.). Der oberste Säulenbereich zeigte eine deutliche gelbgrüne Fluoreszenz, welche sich mit Aceton/ H_2O (1 : 10; 1 : 2) nur in Spuren eluieren ließ. Das eluierbare, schwach fluoreszierende Material wurde chromatographisch aufgetrennt und massenspektroskopisch analysiert (BROWN et al., 1972). Riboflavin konnte nicht nachgewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis führte die Rezirkulation nativer (S)-Tetrahydroprotuberberin Oxidase über eine Florisilsäule. Eine Abtrennung des Coenzym - wie von RAO et al. (1963) beschrieben - konnte also nicht erreicht werden. Hinweise auf das Vorliegen eines abdissoziierbaren Flavinnukleotids wurden also nicht gefunden. Um wirklich auszuschließen, daß nicht doch

ein Flavinnukleotid in einer Proteintasche zurückgehalten wird, wurden 260 µg STOX mit 500 µg Trypsin verdaut (5 h, 37°C, Kaliumphosphat-Puffer 50 mmol/l, pH 7.4), der Ansatz nach Abkühlen angesäuert (pH 4 - 4.5 mit Essigsäure), hitzedenaturiert (10 Min. 96°C), abzentrifugiert und der Überstand über die Florisil-Adsorptionsmethode analysiert (KOZIOL, 1971). Auch in einer Kombination mit Acetonfällung (< 5°C, bis 80% Aceton) konnte kein Flavinnukleotid nachgewiesen werden, ebensowenig nach Totalhydrolyse von 580 µg STOX (6 mol/l HCl, 12 h, 100°C). Der mit einer Nachweisgrenze von 40 pmol Flavin empfindlichste Test, der mikrobiologische Flavinnachweis, wurde mit 252 µg (2.52 nmol) STOX durchgeführt. Das gemessene Bakterienwachstum entsprach einer Flavinmenge von 0.18 nmol, also nur 7% der bei einem äquimolaren Flavin /STOX-Protein-Verhältnis zu erwartenden Menge. Zusammenfassend läßt sich eindeutig sagen, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase kein leicht abdissoziierbares Flavin enthält.

Nachdem jedoch die Evidenz für das Vorliegen eines Flavoenzyms so offensichtlich ist, konnte es sich nur noch um ein kovalent gebundenes Flavin handeln. Fütterungsversuche mit Zellsuspensionskulturen von Berberis wilsoniae hatten gezeigt, daß sich die spezifische Aktivität von STOX durch Riboflavin um den Faktor 1.4 steigern läßt. Vergleichbare Kulturen (75 ml Medium, 6 g Inokulum) waren dazu mit 3.6 µmol/l Riboflavin unter Lichtausschluß 7 Tage gewachsen. Auf das Trockengewicht der Kultur hatte die Riboflavin-Zufütterung keinen Einfluß. Der Einbau von [¹⁴C]-markiertem Riboflavin sollte daher den letzten Beweis bringen, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ein Flavoenzym ist.

Einer Berberis wilsoniae-Kultur (75 ml Medium, 6 g Inokulum) wurden zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase 0.37 MBq ($\approx 22.2 \times 10^6$ dpm) einer sterilen, wässrigen Lösung (60 µl) von D-[2-¹⁴C]-Riboflavin (1.94 GBq/mmol) zugegeben und die Zellen unter Lichtausschluß 8 Tage kultiviert. Die Zellen wurden abfiltriert und - wie beschrieben - aufgeschlossen

(vgl. II. 5.2). Der Rohextrakt wurde über eine XAD 2-Säule (0.25 cm² x 14 cm) von Alkaloiden und freiem Riboflavin befreit und an DEAE-Sephacel adsorbiert. Gebundenes Protein wurde mit einem Stufengradienten (0/0.4 mol/l KCl in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.4) eluiert und die Fraktion mit der höchsten STOX-Aktivität über Mitteldruck-Gelpermeations-Chromatographie (TSK G 3000 SW Säule) aufgetrennt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über das Anreicherungsverfahren, Abbildung 23 zeigt das Elutionsprofil der TSK-Säule. Die STOX-akti-

Präpara- tions- stufe	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Radio- Aktivität (dpm x 10 ⁶)	Gesamt- Protein (mg)	spezif. Aktivität (nkat/mg)
Zellfiltrat	70	-	2.25	-	-
Rohextrakt	39.5	2.6	3.78	37	0.07
XAD-Eluat	39.0	6.9	2.68	36	0.19
DEAE-Sephacel					
-Durchlauf	40	1.0	2.00	27.2	0.03
-Eluat	2.4	4.0	0.33	5	0.80
TSK G 3000 SW	7.2	0.5	0.008	0.6	0.83

Tabelle 5

Anreicherung von [¹⁴C]-Riboflavin-markiertem STOX aus einer Zellsuspensionskultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata, welche 8 Tage in Gegenwart von 10 µCi [¹⁴C]-Riboflavin kultiviert worden war. Die nach Gelpermeations-Chromatographie (TSK G 3000 SW) erhaltene STOX-Präparation enthielt noch 0.036% des markierten Riboflavins.

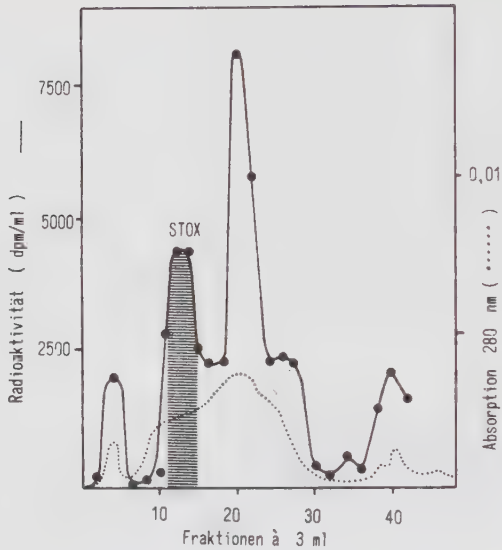


Abbildung 23 Auftrennung eines über Ionenaustauschchromatographie vorgereinigten [14 C]-Riboflavin-markierten Zellextrakts von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* an einer TSK G 3000 SW-Säule (1,15 cm $\times$ 60 cm). Der schraffiert gezeichnete Bereich zeigte STOX-Aktivität und wurde nach denaturierender Gelelektrophorese autoradiographisch untersucht. STOX wurde im optischen Test lokalisiert (vgl. III. 1.1). Äquilibriert und eluiert wurde die Säule mit einem Puffer aus 25 mmol/l Kaliumphosphat mit 25 mmol/l NaCl pH 6.0 bei einer Flußrate von 3.0 ml/Min.

ven Fraktionen wurden vereinigt, durch Zugabe des 4-fachen Volumens Aceton/Methanol (1 : 1) bei -20°C gefällt, abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ l H₂O aufgenommen, in einem 10%igen denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem (vgl. II. 15.2) aufgetrennt und, wie beschrieben, autoradiographisch ausgewertet. Abbildung 24 zeigt das erhaltene Autoradiogramm zusammen mit der Verteilung der Radioaktivität. Die letzten Zweifel am Flavinpro-

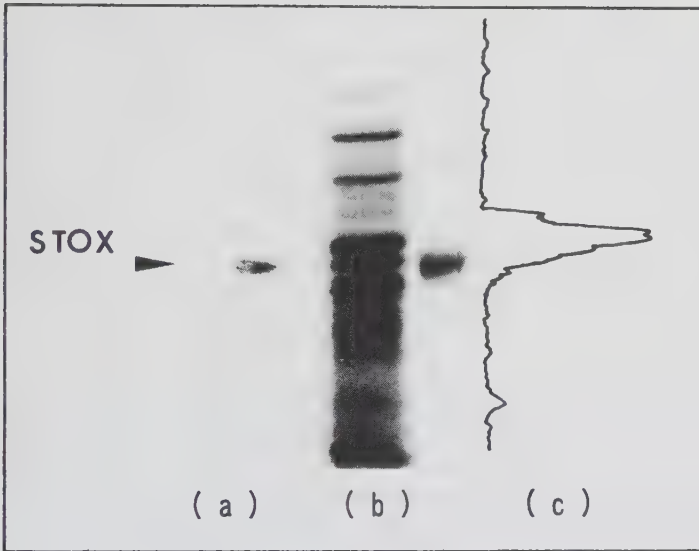


Abbildung 24 Autoradiogramm (a) eines SDS-Polyacrylamidgels (b) eines STOX-angereicherten [^{14}C]-Riboflavin-markierten Zellextrakts. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel wurden 0.3 mg Aceton gefälltes 12-fach angereichertes STOX (2 nkat; 4000 dpm) aufgetrennt. Zur autoradiographischen Analyse wurde das Gel mit Verstärkerfolie 8 Tage bei -70°C exponiert. Spur (c) gibt die Radioaktivitätsverteilung des Acrylamidgels wieder. Die Radioaktivität koinzidiert mit STOX.

tein-Charakter von STOX waren durch den erfolgreichen Einbau von [^{14}C]-Riboflavin in STOX beseitigt. Aus den gemessenen Radioaktivitätswerten (Tabelle 5) ergibt sich folgendes Bild der Verteilung des verfütterten Riboflavins: 90% des angebotenen [^{14}C]-Riboflavins wurden in die Zellen aufgenommen, wobei der größte Teil (73%) durch Einbau in Membranproteine und möglicherweise unspezifische Adsorption an die Zellwand nicht im Rohpreßsaft wiedergefunden werden

konnte. 5% des Riboflavins und seiner Metaboliten liegen gelöst im Zellsaft vor, während die restlichen 12% des [^{14}C]-Riboflavins an Protein gebunden sind. Nur 0.04% des gefütterten Riboflavins konnten in der angereicherten (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wiedergefunden werden. Als einzig unpassender Puzzlestein blieb das für ein Flavoenzym ungewöhnliche UV-Absorptionsspektrum. Nur zwei Möglichkeiten blieben, dieses Spektrum zu erklären. Entweder verhindert starkes intramolekulares "Quenching" die charakteristische UV-Absorption, oder das Flavin liegt zum Großteil in reduzierter Form vor. Eine verbreitete Methode, Flavoproteine im oxidierten Zustand zu halten, besteht in der Behandlung mit Ferricyanid. Inkubiert man 820 μg STOX in 1 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mmol/l, pH 7.4) mit 1 μmol $\text{K}_2 [\text{Fe}_3(\text{CN})_6]$, intensiviert sich mit Ferricyanid-Zugabe die schwach gelbgrünliche Fluoreszenz (366 nm Anregung) deutlich. Die Ferricyanid-induzierte STOX-Fluoreszenz konnte in Kontrollansätzen mit Albumin nicht erzielt werden. Abbildung 25 zeigt ein Differenz-Spektrum von STOX in 1 mmol/l Ferricyanid, pH 7.4, gegen eine gleich konzentrierte Vergleichslösung ohne STOX. Deutlich läßt sich ein für Flavoproteine charakteristisches zweigipfliges Spektrum erkennen. Die Maxima liegen bei 344 und 460 nm. Zur Abtrennung des Oxidationsmittels wurde der Ansatz 1 + 1 mit H_2O verdünnt und die stark gelb gefärbte Lösung auf 1 ml DEAE-Sephacel aufgegeben. Mit einem 1 ml Puls 0.4 mol/l KCl in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer pH 7.4 konnte die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase von der Ionenaustauscher Matrix eluiert werden, wobei das Ferricyanid als gelbe Bande am Gel zurückblieb. Die Frage lautete, ob das einmal oxidierte Flavoenzym im oxidierten Zustand bleibt. Das UV-Absorptionsspektrum zeigte jedoch klar, daß das typische Flavoproteinspektrum nur in Gegenwart von Ferricyanid erhalten werden kann (Abbildung 25).

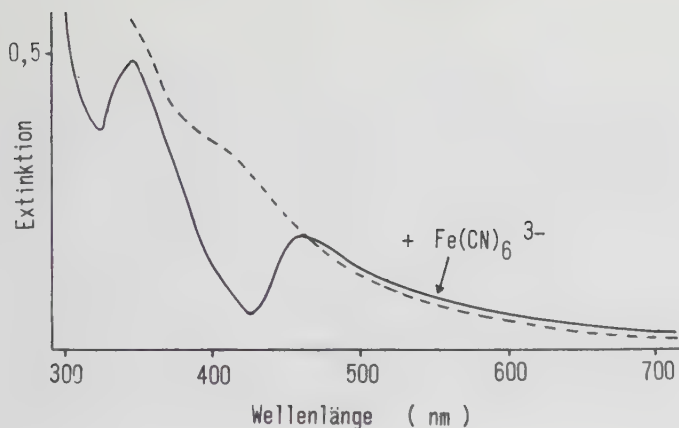


Abbildung 25 Differenzspektrum von gereinigtem STOX (0.82 mg/ml) in Phosphat-Puffer pH 7.4 in Gegenwart von 1 mmol/l Ferricyanid gegen eine Proteinfreie Vergleichslösung. Die unterbrochene Linie zeigt das UV-Spektrum nach Abtrennung von Ferricyanid. Nur unter oxidierenden Bedingungen kann das typische zweigipflige Flavinspektrum beobachtet werden.

3.6 Temperatur-Optimum

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung einer Enzymaktivität ist die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Temperatur. Während bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes viele Enzyme in ihrer Integrität erhalten bleiben, aber keine Enzymaktivität zeigen, steigen in der Regel mit der Temperatur auch die enzymatischen Umsatzraten. Der Temperatur-Coeffizient enzymatischer Reaktionen bewegt sich dabei etwa zwischen 1.4 und 2. Wird die zur Erreichung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit nötige Beweglichkeit des Enzyms durch weitere Zufuhr an Wärmeenergie überschritten, kommt es oft zu reversiblen Konformationsänderungen des Moleküls, was die katalytische Aktivität verringert. Letztendlich faltet sich das Enzym irreversibel um, oft verbunden mit einer völligen Inaktivierung, wobei die Mechanismen der irreversiblen Thermo-inaktivierung im Einzelfall unklar sind (AHERN und KLIBANOV, 1984). Abbildung 26 zeigt die Temperaturabhängigkeit der STOX-Katalyse, gemessen im

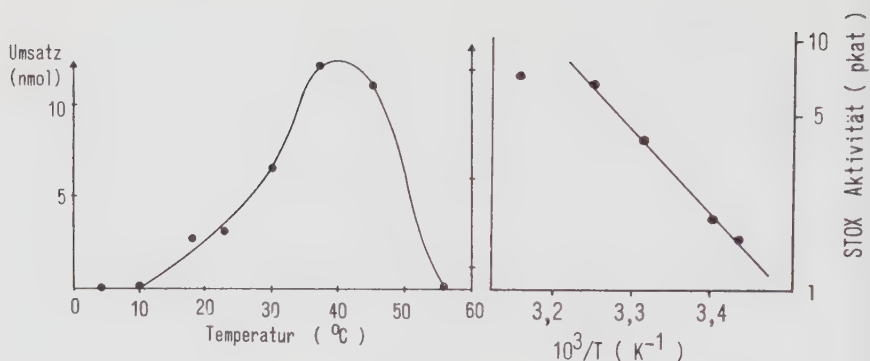


Abbildung 26 Temperaturabhängigkeit der STOX-katalysierten Enzymreaktion, gemessen im Tritium-Ausbautest (vgl. III. 1.4) in linearer (a) und halblogarithmischer (b) Darstellung. Die Standardansätze (10.8 pkat STOX, Boratpuffer, pH 8.9) wurden 45 Min. bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

Tritium-Ausbautest mit 10.8 pkat Enzymaktivität. Optimale katalytische Aktivität entfaltet das STOX bei ca. 40°C. In dem schmalen 10%-Temperatur-Intervall oberhalb von 45°C sinkt die Enzymaktivität drastisch bis auf Null ab. Aus der graphischen Darstellung nach Arrhenius läßt sich im Temperaturbereich von 18° - 30°C für die StOX-katalysierte Reaktion ein Q_{10} -Wert von 2.1 und eine Aktivierungsenergie von 123 kJ/mol entnehmen.

3.7 pH-Optimum

In der überwiegenden Zahl der Fälle sind dissoziablen Aminosäurereste bei der enzymatischen Katalyse im aktiven Zentrum oder zur Aufrechterhaltung der katalytisch aktiven Konformation nötig. Da zudem viele Substrate ebenfalls ionisch vorliegen können, ist offenkundig, daß der pH-Wert über Säure-/Base-Titration die kinetischen Parameter eines Enzyms maßgeblich beeinflusst (FERSHT, 1985). Die pH-Abhängigkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysierten Reaktion ist in Abbildung 27 dargestellt. Die höchste

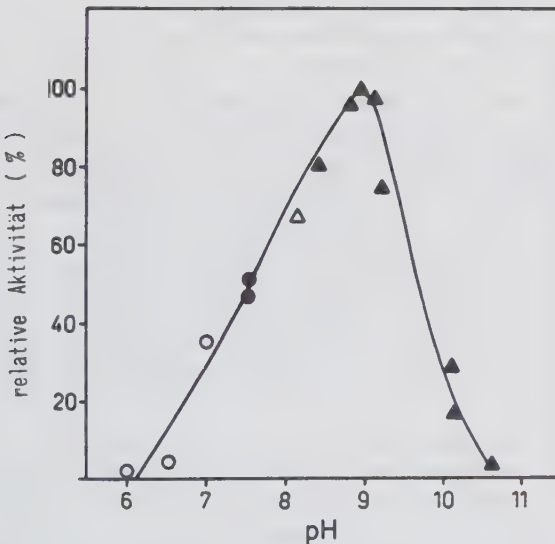


Abbildung 27 pH-Abhängigkeit der STOX-katalysierten Reaktion, gemessen im Standard-Tritium-Ausbaute (vgl. III. 1.4) in verschiedenen gepufferten (jeweils 50 mmol/l) Standardansätzen mit je 3.8 pkat Enzymaktivität. $\Delta\Delta\Delta$ Glycin/NaOH; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ Tris/HCl; $\bullet\bullet\bullet$ Na/K-Phosphat; $\circ\circ\circ$ Citrat/NaOH.

Umsatzrate zeigte das Enzym bei pH 8.9. Die Substrate liegen bei diesem Wert stets in der ungeladenen Form als freie Base vor. Die mit gereinigtem Enzym erhaltene glockenförmige symmetrische Kurve wurde auch mit schwach angereicherten Rohextrakten erhalten.

3.8 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Titration eines an eine Anionenaustauscher-Matrix adsorbierten Proteins mit Säure führt sukzessive zur Protonierung seiner dissoziierten, negativ geladenen Aminosäurereste. Ist der Punkt, an dem sich positiv und negativ geladene Gruppen nach außen hin ausgleichen, erreicht, wird das Protein in einer Lösung von der Säule eluiert, deren Säuregrad seinem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht. Die pH-abhängige Elution gebundenen Proteins von einem speziell gepufferten Anionenaustauscher mit ampholytischem Puffer ließ sich zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts des STOX-Enzyms ausnützen (Chromatofokussierung). 10 ml STOX (2.9 nkat in 25 mmol/l Tris /Acetat-Puffer, pH 8.3) wurden auf eine mit Probenpuffer äquilibrierte und mit 2 ml Elutionspuffer (1.5 ml Pharmacia PB 96/3.5 ml PB 74, pH 5.0 mit Essigsäure; 1 : 10 mit Wasser) vorgewaschene Säule (PBE 94, Pharmacia, 0.27 cm² x 15 cm) aufgepumpt (0.2 ml/Min.) und mit Elutionspuffer desorbiert. Der pH-Wert der Fraktionen wurde gemessen und die STOX-Aktivität im optischen Standardtest lokalisiert. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis. Der pI der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase beträgt 5.7. Eine nachgeschaltete Elution bis pH 4.0 enthielt keine STOX-Aktivität. Die Aktivitätsverluste bei diesem recht eleganten Verfahren sind wegen der Säureempfindlichkeit von STOX recht drastisch. So konnten nur noch 13% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden. Als Methode zur präparativen Darstellung von enzymatisch aktivem STOX-Enzym ist dieses Verfahren daher nicht geeignet.

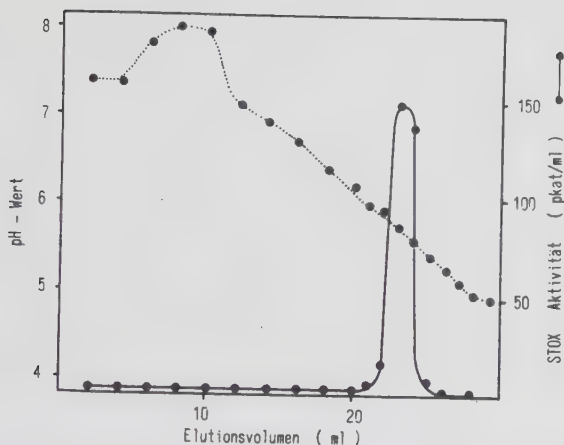


Abbildung 28 Bestimmung des isoelektrischen Punkts (pI) von (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase durch Chromatofokussierung an einer Polybuffer 94-Exchanger-Säule (Säulendimension: $0.27 \text{ cm}^2 \times 15 \text{ cm}$). Die Elution von STOX erfolgte bei einer Flußrate von 0.2 ml/Min. mit einer $1 : 10$ verdünnten Lösung aus 1.5 ml Pharmacia PB 96 und 3.5 ml PB 74 (pH 5.0). STOX wurde im optischen Standardtest mit (S)-Norretikulin als Substrat bestimmt.

3.9 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht des nativen Enzyms ließ sich bereits ohne Kalibrierung aus verschiedenen Materialparametern abschätzen. Bei Gelfiltration mit Ultrogel AcA 54, für welches eine Ausschußgrenze für globuläre Proteine von 70 kD angegeben wird, wird STOX im Ausschußvolumen eluiert (vgl. STEFFENS, 1984), was belegt, daß das Molekulargewicht von STOX größer als 70 kD ist. Verwendet man als Chromato-

graphie-Matrix Ultrogel AcA 44 (Ausschlußgrenze 130 kD; Abbildung 10), eluiert STOX früh, aber nicht im Ausschlußvolumen, daher sollte STOX signifikant kleiner als 130 kD sein. Versucht man STOX-Präparationen über Ultrafiltration mit YM 100 Membranen (Amicon) zu konzentrieren, wird der Hauptanteil des Enzyms (85%) zurückgehalten. STOX sollte demnach nicht wesentlich größer als 100 kD sein. Die Bestimmung des Verteilungs-Coeffizienten auf einer kalibrierten Sephadex G-100 Säule ergab einen K_{AV} -Wert nahe Null, entsprechend einem Molekulargewicht von 100 000. In sehr guter Übereinstimmung damit wurde das Molekulargewicht des nativen Enzyms über Gelpermeations-Chromatographie (vgl. III. 3.10) an einer geachten TSK G 3000 SW Säule zu $105 \text{ kD} \pm 10\%$ bestimmt (Abbildung 29 A). Unter denaturierenden Bedingungen wurde für die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase über Disc-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von $53 \text{ kD} \pm 6\%$ bestimmt (vgl. II. 2.5). Die Auswertung eines solchen Gels zeigt Abbildung 29 B. Da das native Protein über ungefähr das 2-fache Molekulargewicht verfügt, muß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase nativ als dimeres Protein vorliegen.

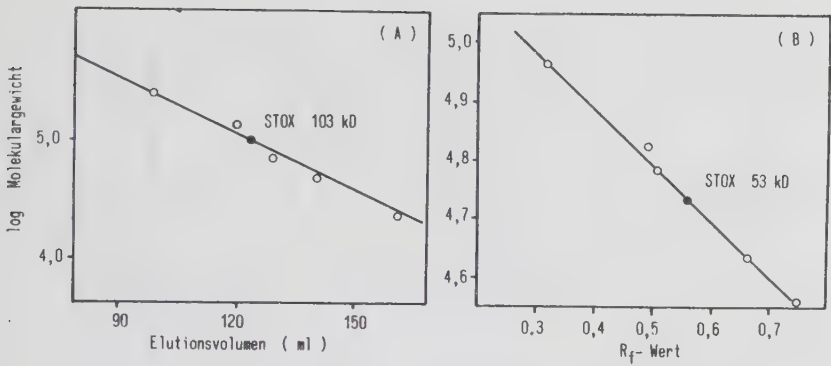


Abbildung 29

Bestimmung des Molekulargewichts der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase durch Gelpermeationschromatographie (A) und diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (B).

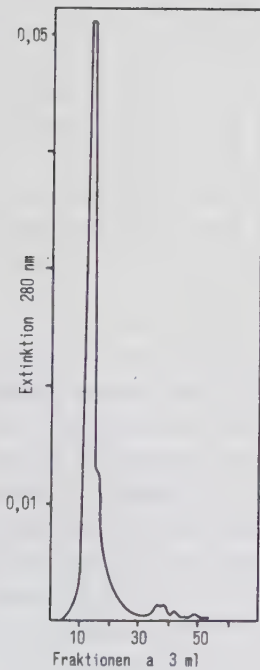
(A) Auftrennung von 0.9 nkat STOX auf einer TSK G 3000 SW-Säule. Zur Kalibrierung dienten Myoglobin (17.8 kD), Carboanhydrase (29 kD), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (36 kD), Ovalbumin (45 kD), Rinderserumalbumin (66 kD); weitere technische Angaben in III. 3.10.

(B) Darstellung der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung von 8.8 μ g STOX in einem 7.5%igen Acrylamidgel. Als Molekulargewichtsmarker dienten: Lactatdehydrogenase (36 kD), Ovalbumin (43 kD), Katalase (60 kD), Rinderserumalbumin (67 kD), Phosphorylase (94 kD).

3.10 Aminosäureanalyse

Im Hinblick auf eine weitergehende molekularbiologische Bearbeitung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ist es wichtig, einige proteinchemische Charakteristika von STOX zu kennen. Neben der Aminosäurezusammensetzung des Proteins ist dabei vor allem der N-Terminus von Bedeutung, da nur bei Vorliegen einer freien Aminogruppe eine Ansequenzierung des Enzyms vom Ende her möglich ist. Eine Vorstellung über eine eventuelle Glykosilierung des Enzyms kann darüber hinaus im Hinblick auf zukünftige heterologe Expressionssysteme von Bedeutung sein. Notwendige Voraussetzung gerade für die beiden ersten Punkte ist absolut Fremdprotein-freies Enzym. Zu diesem Zweck wurde die STOX-Proteinbande bei der die Reinigung abschließenden präparativen gelelektrophoretischen Auftrennung (vgl. II. 2.4) besonders knapp aus dem Gel ausgeschnitten und die nach Elektroelution gelbe Proteinlösung (0.97 mg/ml) über Gelpermeations-Chromatographie nachgereinigt. Dazu wurden 1.8 ml des gereinigten STOX (3.1 nkat, 1.55 mg Protein) mit 3 ml/Min. über eine TSK G 3000 SW Säule ($1.15 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ cm}$) gepumpt (6°C). Äquilibriert und eluiert wurde die TSK Säule mit einem Puffer aus 25 mmol/l Kaliumphosphat und 25 mmol/l NaCl von pH 6.0. Die 3 ml-Fraktionen wurden sofort durch Zugabe von 30 μl 1 mol/l NaOH neutralisiert, um die Enzym-Aktivitätsverluste in Grenzen zu halten. Das Elutionsprofil zeigt Abbildung 30. Die zwei STOX-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und zur Abtrennung der Salze und Konzentrierung des Proteins durch Zugabe des 4-fachen Volumens Methanol/Aceton 1: 1 bei -20°C präzipitiert. Das abzentrifugierte, im UV-Licht (366 nm) gelbgrün fluoreszierende Pellet wurde zur Aminosäureanalyse verwendet. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure verlief erfolglos. Die gefundenen Aminosäuremengen entsprachen nicht annähernd der Menge des eingesetzten Proteins, woraus zu folgern war, daß der N-Terminus in irgendeiner Weise blockiert ist.

Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung von STOX wurden nunmehr 0.25 mg Protein in 200 μl Wasser gelöst und mit der



Aminosäure	(%)
Asparagin	13.9
Asparaginsäure	
Threonin	4.2
Serin	6.7
Glutamin	8.1
Glutaminsäure	
Glycin	6.8
Alanin	5.6
Cystein*	2.1
Valin	5.9
Methionin	2.4
Isoleucin	5.8
Leucin	5.6
Tyrosin	2.4
Phenylalanin	3.6
Lysin	14.2
Histidin	1.8
Arginin	2.2
Prolin	7.6
Tryptophan	n.d.**

*als Halbcystin

**nicht detektierbar

Abbildung 30

Nachreinigung von elektrophoretisch sauberem STOX an TSK G 3000 SW und Aminosäureanalyse.

Säulendimension: $1.15 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ cm}$; Elutionspuffer: 25 mmol/l Kaliumphosphatpuffer mit 25 mmol/l NaCl pH 6.0; Flußrate: 3 ml/Min. Die 1.8 ml Probe enthielt 3.1 nkat STOX und 1.55 mg Protein. Die Aminosäureanalyse des hydrolysierten STOX-Proteins erfolgte wie unter II. 10 beschrieben.

gleichen Menge konzentrierter Salzsäure in einem unter Unterdruck abgeschmolzenen Glasröhrchen 20 h bei 110°C hydrolysiert. In gleicher Weise wurden Lysozym und Rinder-serumalbumin als Vergleichsproteine hydrolysiert. Die chromatographische Analyse wurde, wie in II. 10 beschrieben, durchgeführt. Über den Vergleich der gefundenen Aminosäurezusammensetzung der Referenzproteine mit den tatsächlichen Werten (DAYHOFF, 1972 und 1976) wurden die für jede Aminosäure nötigen Korrekturfaktoren ermittelt. Die korrigierten Werte für die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase sind in Abbildung 30 wiedergegeben.

Zum Nachweis modifizierender Zuckerreste am Protein wurden 43 µg elektrophoretisch sauberes STOX unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbande nach Fixierung und Perjodatoxidation, wie beschrieben (II. 15.2), sichtbar gemacht. Die STOX-Bande zeigte nur eine äußerst schwache rötliche Färbung, wenngleich die aufgetragene Proteinmenge beträchtlich war. Bei STOX kann man daher nicht von einem stark glykosilierten Protein sprechen.

3.11 Substratspezifität

Die unterschiedlich ausgeprägte Eigenschaft eines Enzyms, ein spezifisches Molekül oder ein bestimmtes Strukturelement zu erkennen, ist eine Möglichkeit, welche es Organismen erlaubt, Stoffwechselwege in so hochkomplexen heterogenen Räumen wie dem Cytosol koordiniert durchzuführen. Daß STOX absolut stereospezifisch das (R)-Enantiomere diskriminiert und daß der (S)-Form die Elektronen der C-N-Bindung entzogen werden, wurde in III. 3.1 und 3.4 bereits ausgeführt. Unklar war, welche Rolle die unmittelbare Umgebung der zu oxidierenden Bindung für die STOX-katalysierte Oxidation der 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine spielt, inwiefern also die unterschiedlichen Substituenten der beiden Molekülgerüste die katalytische Umsetzbarkeit beeinflussen. Der optische Test (III. 1.1), die kinetische Aufnahme von UV-Spektren der Testansätze und die Dünnschicht-

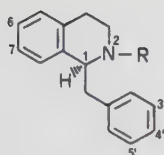
Chromatographie der Ansätze vor und nach NaBH_4 -Reduktion (Laufmittel 1 - 8 in II. 14) waren die geeignetsten Methoden, diese Frage zu beantworten. Die zu quantitativen Bestimmung nötigen Extinktions-Coeffizienten wurden unter Inkubationsbedingungen - wie beschrieben (III. 1.1) - ermittelt. Da die oxidierten Produkte nicht in allen Fällen vorhanden waren oder synthetisiert werden konnten, wurden deren Extinktions-Coeffizienten, soweit sie in der Literatur nicht angegeben waren, abgeschätzt. Da die molaren Extinktions-Coeffizienten der Protoberberine sehr ähnlich sind, dürfte der Schätzfehler nicht größer als 10% sein. Die zur Berechnung der Umsatzraten herangezogenen Extinktions-Coeffizienten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Vergleichen lassen sich Umsatzraten nur, wenn sie unter Bedingungen gemessen werden, unter denen keine Substratlimitierung vorliegt. Die zum Teil extrem schlechte Löslichkeit der 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine im alkalischen, wässrigen Milieu ließ diese Bedingung möglicherweise in Einzelfällen unerfüllt. War es absolut nicht möglich, auch nur geringste Mengen zu lösen, wie im Falle der Dibenzyl-oxy-Verbindung von A. BROSSI oder des von K. RICE zur Verfügung gestellten Tetrahydrobenzylisochinolins, mußte im ersten Fall die Verbindung debenzyliert werden (3 mol/l HCl in Methanol; 100°C, 15 Min. - Substanz B in Tabelle 7), oder die Umsatzrate im Säuren (pH 6.1) gegen ein Vergleichssubstrat bestimmt werden (Substanz R in Tabelle 7). Verglichen wurden die Umsatzraten der 1-Benzylisochinoline mit (S)-Norretikulin, die der Tetrahydroprotoberberine mit (S)-Scoulerin. Die Ansätze enthielten in 1000 µl Gesamtvolumen 30 pkat elektrophoretisch gereinigtes STOX, je nach Löslichkeit 8 - 200 nmol Substrat und 100 µmol Borat-Puffer pH 8.9. Tabelle 7 faßt die Ergebnisse für die 1-Benzylisochinoline zusammen. Alle angebotenen 1-Benzylisochinoline wurden von STOX oxidiert. Die Modifizierung der von STOX oxidierten C-N-Bindung durch N-Methylierung verschlechtert die Umsetzbarkeit jedoch drastisch. Gute Umsatzraten wurden bei all den Substraten beobachtet, deren

	Wellenlänge [nm]	Extinktions-Coeffizient [10 ⁶ cm ² /mol]
Dehydronorprotosinomenin	390	8.1
Dehydronorisoorientalin	380	7.1
Dehydroscoulerin	374	10.4
Dehydrocoreximim	370	18.0
Jatrorrhizin	369	25.2
"Dehydroprotosinoberbin" ⁺	369	25.2*
Dehydrocoramin	369	25.2
Columbamin	369	25.1
Dehydrodiscretamin	367	25.0*
Stepharanin	367	15.0*
Dehydrocapaurimin	362	20.9
Dehydro-0-Methyl- corytenchirin	360	20.0*
Dehydronororientalin	360	3.9
Dehydroretikulin	360	5.2
Coptisin	350	31.6
Dehydrocorydalmin	347	17.0
Palmatin	345	36.6
Berberin	345	25.4
Papaverin	340	6.3
Dehydronorretikulin	340	3.3

⁺2,10-Dimethoxy-3,9-Dihydroxy-Tetrahydroprotoberberin

*geschätzte Werte

Tabelle 6 Extinktions-Coeffizienten, welche zur Quantifizierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysierten Produktbildung herangezogen wurden.



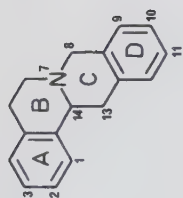
	Umsatz- rate(%)	2	6	7	3'	4'
Norreti- kulin	100	H	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
Substanz R ¹	67*	H	OCH ₃	-	OH	OCH ₃
Nororien- talin	49	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
Tetrahydro- papaverin	43	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Cocclaurin	31	H	OCH ₃	OH	-	OH
Substanz B ²	28	H	OCH ₃	-	OH	(5'-OH)
Norisoorien- talin	16	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
Norprotosi- nomenin	10	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Retikulin	1	CH ₃	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
Orientalin	< 1	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
Isoorien- talin	< 1	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
Protosi- nomenin	< 1	CH ₃	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Norlaudano- solin	< 1	H	OH	OH	OH	OH
6-OMe-Norlau- danosolin	< 1	H	OCH ₃	OH	OH	OH

¹ von K. RICE zur Verfügung gestellt, ² von A. BROSSI als Benzylderivat zur Verfügung gestellt, * bei pH 6.1 gemessen.

Tabelle 7 Zusammenstellung der Benzylisochinolin-Alkaloide, welche von STOX als Substrate akzeptiert werden. Die Ansätze enthielten in 1 ml Gesamtvolumen 30 pkat STOX, 80 µmol Substrat und 100 µmol Boratpuffer pH 8.9. Die im optischen Test gemessenen Umsatzraten sind in (%) angegeben. Die Michaelis-Konstante für (S)-Norretikulin beträgt 0.15 mmol/l, mit (R,S)-Retikulin konnte ein K_M-Wert von 0.5 mmol/l ermittelt werden.

Hydroxylfunktion am Isochinolinkohlenstoff 6 methyliert ist, doch scheint auch der Benzylrest die Umsatzrate zu beeinflussen, wie der Vergleich von 6-O-Methylnorlaudanolin mit der Spitzengruppe der Benzylisochinolin-Tabelle zeigt. Das Ergebnis für die 2. große Substratklasse, die Tetrahydroprotoberberine, faßt Tabelle 8 zusammen. Ausgeprägter noch als im Fall der Benzylisochinoline verhindert hier die Einführung einer Methylgruppe am Stickstoff die enzymatische Oxidierbarkeit völlig (Canadin/N-Methylcanadin). Neben einer möglichen sterischen Hinderung für STOX bedeutet die N-Methylierung auch eine Quaternisierung des Isochinolinstickstoffes. Da die enzymatische Oxidation über ein 7,14-Iminiumintermediat verläuft, ist eine quaternäre Verbindung als Substrat nicht vorstellbar. In einer noch zu diskutierenden Weise scheint ein unmodifizierter C-Ring für die STOX-Katalyse unbedingt notwendig zu sein. Substrate, welche hohe Umsatzraten zeigen, wie Tetrahydropalmin, Tetrahydrojatrorrhizin (= Corypalmin) oder Stylopin, werden durch Methylierung am C-13 (Corydalin, Corybulbin, Tetrahydrocorysamin) zu nicht mehr enzymatisch oxidierbaren Verbindungen. Nicht ganz so dramatisch, aber tendenziell gleich wirkt sich Hydroxylierung von Corydalmin am C-Atom 1 aus. Die peripheren Substitutionsmuster (Positionen 2,3,9,10,11) hingegen beeinflussen die Umsetzbarkeit nur in qualitativer Weise. Besonders günstige oder ungünstige Anordnungen lassen sich nicht erkennen. Die Entscheidung über die enzymatische Umsetzbarkeit von 1-Benzylisochinolin und Tetrahydroprotoberberinen wird also ganz wesentlich vom Substitutionsmuster in unmittelbarer Nachbarschaft der zu oxidierenden C1 - N2 bzw. C14 - N7-Bindung bestimmt.

Soweit möglich, waren die Umsatzraten unter Substratsättigung bestimmt worden. Bei sukzessiver Verringerung der Substratkonzentration gelangt man mit den meisten Enzymen in einen Bereich, in dem die Umsatzgeschwindigkeit im Sinne einer Reaktion erster Ordnung direkt proportional der Substratkonzentration ist. Diesen Zusammenhang zwischen Substrat-



	Umsatz- rate %	1	2	3	7	8	9	10	11	13	K_M [$\mu\text{mol/l}$]
S Scoulerin	100	-	OH	OMe	-	-	OH	OMe	-	-	25
R,S Canadin	97	-	0	CH ₂ 0	-	-	OMe	OMe	-	-	13.3
S Coreximim	88	-	OH	OMe	-	-	-	OMe	OH	-	-
R,S Tetrahydropalmatin	23	-	OMe	OMe	-	-	OMe	OMe	-	-	4.3
R,S Corypalmim	21	-	OMe	OH	-	-	OMe	OMe	-	-	0.7
S Corydalmim	8	-	OMe	OMe	-	-	OMe	OH	-	-	-
S Stylopin	5	-	0	CH ₂ 0	-	-	0	CH ₂ 0	-	-	-
R,S Isocorypalmim	4	-	OH	OMe	-	-	OMe	OH	-	-	-
S "protosinoberbin"	3	-	OMe	OH	-	-	OH	OMe	-	-	-
S Coramin	3	-	OMe	OH	-	-	-	OMe	OH	-	-
R,S Stepholidin	1	-	OH	OMe	-	-	OMe	OH	-	-	-
R,S Discretamin	0.2	-	OMe	OH	-	-	OMe	OH	-	-	-

siehe Fortsetzung

Fortsetzung

	Umsatz- rate %	1	2	3	7	8	9	10	11	13	K_M [$\mu\text{mol/l}$]
R,S OMe-Corytenchirin	0.1	-	OMe	OMe	-	Me	-	OMe	OMe	-	-
R,S Capaurimin	0.1	OH	OMe	OMe	-	-	OMe	OH	-	-	-
R,S Corydalin	0	-	OMe	OMe	-	-	OMe	OMe	-	Me	-
S Escholidin	0	-	0 CH ₂ O	0	Me	-	OMe	OH	-	-	-
S N-Me-Canadin	0	-	0 CH ₂ O	0	Me	-	OMe	OMe	-	-	-
R,S Tetrahydrocorysamin	0	-	0 CH ₂ O	0	-	-	0 CH ₂ O	-	-	Me	-
R,S Corybulbin	0	-	OMe	OH	-	-	OMe	OMe	-	Me	-
R Coramin	0	-	OMe	OH	-	-	-	OMe	OH	-	-
R Corybulbin	0	-	OMe	OH	-	-	OMe	OMe	-	Me	-
R Capaurimin	0	OH	OMe	OMe	-	-	OMe	OH	-	-	-

Tabelle 8

Zusammenstellung der als Substrate für die (S)-Tetrahydroprotuberberin Oxidase getesteten Tetrahydroprotuberberin-Alkaloide. Die Ansätze enthielten in 1 ml Gesamtvolumen 30 pkat STOX, je nach Löslichkeit 8 - 200 μmol Substrat und 100 μmol Boratpuffer pH 8.9. Die Messungen erfolgten im optischen Test bei 25°C. Die vorliegende Stereokonfiguration an C-14 (R oder S), die relativen Umsatzraten (%) und einige Michaelis-Konstanten sind angegeben.

menge und Anfangsgeschwindigkeit einer Enzym-katalysierten Reaktion hatten MICHAELIS und MENTEN (1913) und später BRIGGS und HALDANE (1925) mathematisch in einer Hyperbelfunktion mit orthogonalen Asymptoten formuliert. Gleichgewichtskonstante des Enzym-Substrat-Produktkomplexes (K_M) und die Maximalgeschwindigkeit der Katalyse (V_{max}) lassen sich daraus rechnerisch oder graphisch ermitteln. Zur Untersuchung der STOX-katalysierten Reaktion, an welcher als zweiter Reaktionspartner O_2 beteiligt ist, mußte die O_2 -Konzentration in einem Bereich liegen, welcher seinen K_M -Wert wesentlich übersteigt. Da dieser Wert experimentell nicht zugänglich war und die Maximalkonzentration ohnehin durch die Gaslöslichkeit bestimmt wird, wurden die kinetischen Parameter mit O_2 -gesättigten Lösungen bestimmt. Von besonderem Interesse waren natürlich (S)-Norretikulin und (S)-Scoulerin, da sie in ihrer Substanzklasse jeweils die höchsten Umsatzraten gezeigt hatten. Die Substratabhängigkeit wurde im optischen Test bestimmt. Die Inkubationsansätze enthielten in 900 μ l Gesamtvolumen 7.3 pkat elektrophoretisch sauberes STOX, 37.5 - 600 nmol (S)-Norretikulin und 70 μ mol Boratpuffer pH 8.9. Entsprechend der Inkubationstemperatur von 27°C ergibt sich eine O_2 -Konzentration von 237 μ mol/l. Die entsprechenden Ansätze mit Scoulerin enthielten in 670 μ l Gesamtvolumen ebenfalls 7.3 pkat STOX, 0.13 - 40.2 nmol (S)-Scoulerin und 52 μ mol Boratpuffer pH 8.9. Die Anfangsgeschwindigkeiten des enzymatischen Umsatzes wurden für jeden Substratwert graphisch bestimmt und in der linearisierten, doppeltreziproken Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellt (Abbildung 31). Für (S)-Norretikulin wurde ein K_M -Wert von 0.15 μ mol/l und ein V_{max} von 0.12 nmol/s, für (S)-Scoulerin ein wesentlich höherer Wert für die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit von 25 μ mol/l bei einer Maximalgeschwindigkeit von 33 pmol/s bestimmt. Da Jatrorrhizin, Palmatin und Berberin die Hauptalkaloidprodukte der untersuchten Berberis wilsoniae-Zellkultur sind, wurden die zugehörigen K_M -/ V_{max} -Werte der jeweiligen reduzierten Substrate bestimmt. Die Substrate lagen jeweils in optisch

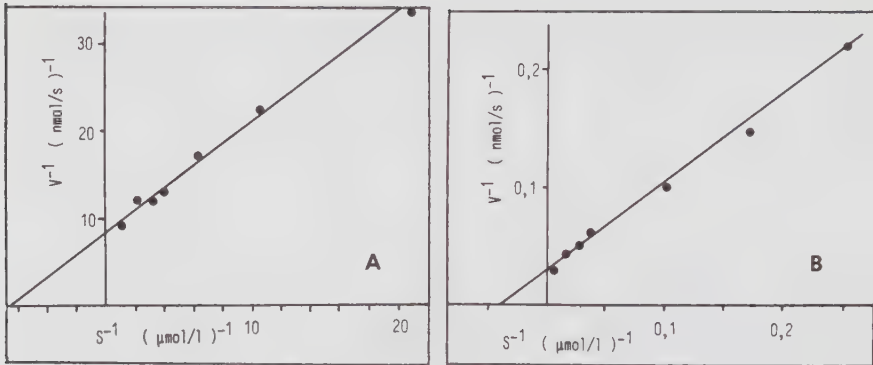


Abbildung 31

Substratabhängigkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase, gemessen im optischen Test mit (S)-Norretikulin (A) und (S)-Scoulerin (B) als Substrat. Ansatz (A) enthielt 7.3 pkat STOX, 37.5 - 600 nmol (S)-Norretikulin und 70 μmol Boratpuffer pH 8.9 in einem Gesamtvolumen von 0.9 ml. Ansatz (B) enthielt 7.3 pkat STOX, 0.13 - 40.2 nmol (S)-Scoulerin und 52 μmol Boratpuffer pH 8.9. Die kinetischen Parameter wurden aus den bei 27°C gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der STOX-katalysierten Oxidation ermittelt.

inaktiver Form vor. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zeigte folgende K_M -/ V_{max} -Werte: Canadin 13.3 $\mu\text{mol/l}$, 27.4 nmol/s; Tetrahydropalmitin 4.3 $\mu\text{mol/l}$, 20.8 pmol/s; Corypalmin 0.66 $\mu\text{mol/l}$, 1.2 pmol/s.

Neben der Michaelis-Konstanten (K_M) ist auch der K_{cat} -Wert eine charakteristische Kenngröße jedes Enzyms. Er ist eine Konstante einer Reaktion erster Ordnung und gibt die maximale Zahl von Substratmolekülen an, welche pro aktivem Zentrum in einer Minute zum Produkt umgesetzt werden. Die höchste für STOX mit (S)-Norretikulin bestimmte spezifische Aktivität betrug 35.5 nkat/mg. Für ein Enzym mit 105 kD und

einem aktiven Zentrum errechnet sich demnach eine Wechselzahl von 224 pro Minute, bei zwei aktiven Zentren von 112 pro Minute. Dieser Wert kann nur als minimaler Wert betrachtet werden, da über die funktionelle Intaktheit des reinen Enzyms keine Aussage gemacht werden kann. Gegenüber dem biosynthetisch vorhergehenden Berberinbrücken-Enzym zeigt die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase eine fast 10-fach höhere Wechselzahl, verglichen mit Enzymen des Primärstoffwechsels, wie z.B. der Succinat-Dehydrogenase (1150 pro Min.). ist es ein relativ niedriger Wert.

3.12 Hemmstoffe

Die katalytische Aktivität eines Enzyms kann durch Wechselwirkungen des Proteins mit niedermolekularen Stoffen wesentlich beeinflusst werden. Aus der Spezifität und Reaktivität inhibierender Substanzen lassen sich oft Rückschlüsse auf essentielle Strukturelemente des Enzyms ziehen. Um die Auswirkungen möglicher Hemmstoffe auf STOX quantitativ zu erfassen, wurde die STOX-Aktivität in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Verbindung im optischen Standardtest oder dem ^3H -Ausbaute test gemessen. Zunächst wurde untersucht, inwiefern die Produkte der STOX-katalysierten Reaktion selbst, Protoberberine und H_2O_2 , die katalytische Aktivität beeinflussen und ob STOX durch die Anwesenheit "falsch" konfigurierter Substrate (z.B. (R)-Norretikulin) gehemmt wird. Da Metallionen bei vielen biologischen Oxidationen eine essentielle Rolle spielen, wurde ihre mögliche Beteiligung an der STOX-Katalyse untersucht. Schließlich wurde die Hemmbarkeit von STOX mit Verbindungen analysiert, welche spezifisch mit Thiol- oder Aminogruppen reagieren können.

Die Steigerung der spezifischen Enzymaktivität nach Abtrennung der überwiegend aus Alkaloiden bestehenden niedermolekularen Substanzen aus Rohextrakten (vgl. Anreicherungstabellen in III. 2) hatte bereits darauf hingedeutet, daß die oxidierten Produkte der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase selbst das Enzym inhibieren. Versuche zur Quanti-

fizierung dieses Effekts erwiesen sich als ausgesprochen schwierig, da die oxidierten Protoberberine, wie z.B. Jatrorrhizin, überraschenderweise im ^3H -Ausbautest die Kontrollwerte stark erhöhten und im optischen Test wegen der hohen molaren Extinktion dieser Verbindungen Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ nicht überschritten werden konnten. Vorsichtige Abschätzungen zeigen, daß die oxidierten STOX-Produkte (Jatrorrhizin, Berberin) in Konzentrationen von 0.35 mmol/l zu einer 33%igen reversiblen Enzymhemmung führen. Eine wesentlich größere Hemmung wurde nie beobachtet. Auch das Coprodukt der enzymatischen STOX-Katalyse, Wasserstoffperoxyd, erwies sich stark inhibierend. Im optischen Test zeigte sich eine 50%-Hemmung der Enzymaktivität bei 0.3 mmol/l. Dies könnte als Hinweis auf eine stark oxidationsempfindliche Struktur im Enzym hindeuten.

Bietet man neben dem physiologischen (S)-konfigurierten Substrat das optische Spiegelbild an, so wurde für Norretikulin bei einem 10-fachen Überschuß (0.1 mmol/l) des (R)-Enantiomeren eine Halbierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidaseaktivität gemessen. Diese Beobachtung könnte insofern von Bedeutung sein, daß in einer physiologischen Situation, in welcher sich Benzylisochinoline mit (R)-Konfiguration anhäufen, die Biosynthese dieser Verbindungen, welche möglicherweise über STOX und eine postulierte Reduktase erfolgt, auf der frühest möglichen Stufe unterbrochen werden könnte.

Die Beteiligung von Metallionen an der enzymatischen Katalyse ist für viele Oxidasen gezeigt worden. Versuche, ein möglicherweise STOX-assoziiertes Kation zu komplexieren, zeigten, daß kein komplexierbares Metallion für die enzymatische Katalyse von Bedeutung ist. So hatte Dialyse gegen 10 mmol/l Na_2EDTA oder die Inkubation mit dem Eisenkomplexbildner 1,10-Phenanthrolin keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Zum gleichen Ergebnis führten Versuche mit KCN (bis 22 mmol/l) und NaN_3 (bis 40 mmol/l). Letztärer Befund war insofern wichtig, als Natriumazid als Katalase-Inhibitor (quantitative Hem-

mung der Berberis Katalasen bei 0.5 mmol/l) verwendet wurde, um in vivo die STOX-katalysierte H_2O_2 -Bildung nachweisen zu können (vgl. III. 4.3.1). Ob allerdings Metallionen selbst die STOX-Aktivität beeinflussen können, mußte geklärt werden. Der Effekt von Metallionen wurde im Standardtest mit 7.5 pkat Enzym ermittelt. Komplexierende Phosphationen waren aus der Enzympräparation durch Dialyse gegen 0.1 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 8.1, bzw. 0.1 mol/l HEPES/NaOH, pH 8.6, entfernt worden. Die Metallionen wurden in einer Konzentration von 10 mmol/l als Chloride den Standardansätzen zugegeben. Tabelle 9 stellt die gefundenen Resultate dar. Eine ausgeprägte Hemmung von STOX konnte nur in Gegenwart von Quecksilber-, Silber- und Cadmiumionen beobachtet werden. Die genauere Analyse zeigte, daß bereits 0.065 mmol/l $HgCl_2$ zur Halbierung der Enzymaktivität führen, 0.2 mmol/l inaktivieren völlig, während die gleiche Konzentration $AgNO_3$ STOX noch nicht beeinträchtigt. Bei 1.4 mmol/l Cd (II) verringert sich die STOX-Aktivität nur wenig, während $AgNO_3$ in dieser Konzentration zu quantitativen Aktivitätsverlusten führt. Dieser Befund weist stark auf das Vorliegen einer essentiellen Thiofunktion hin. Inkubation mit SH-modifizierenden Agenzien (0.5 mmol/l) allerdings zeigte fast keine Hemmeffekte (Jodacetamid, N-Äthylmaleinimid, p-Hydroxymercuribenzoessäure, 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoessäure), Jodosobenzoessäure).

2,4-Pentandion reagiert selektiv mit Arginin- und Lysinresten (GILBERT und O'LEARY, 1975). Die geringe Konzentration von 0.5 mmol/l genügte bereits, die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase quantitativ zu inaktivieren (50% Inhibition bei 0.1 mmol/l). Die Hemmung ist voll reversibel. Die Befunde machen es wahrscheinlich, daß neben einer recht geschützten essentiellen SH-Gruppe auch ein oder mehrere basische Aminosäurereste für die katalytische Aktivität von ausschlaggebender Bedeutung sind.

Metall- ion	Hemmung (%)	Metall- ion	Hemmung (%)
Li	14	FeII	53
Na	10	FeIII	12
K	16	Co	31
Rb	13	Ni	10
Cs	0	Cu	3
Mg	16	Zn	53
Ca	14	Sn	40
Ba	7	Hg	100
Mn	10	Ag	100
		Cd	100

Tabelle 9 Hemmung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysierten (S)-Norretikulin Oxidation durch verschiedene Metallionen. Die Messung erfolgte im Standardtest bei pH 8.9 mit 7.5 pkat STOX. Alle Metallionen lagen als Chloride in einer Konzentration von 10 mmol/l vor (Ausnahme: AgNO₃, CdSO₄). Komplexierende Phosphationen waren durch Dialyse gegen Tris / HCl-Puffer bzw. HEPES/NaOH entfernt worden.

Eine ganze Reihe von Substanzen wurde beschrieben, den Elektronentransport verschiedener Flavoproteine zu inhibieren; Rhein und Dicoumarol seien nur zwei Beispiele (EGERER et al., 1982; EGERER und SIMON, 1982). Schlußfolgerungen von einer beobachteten Hemmwirkung auf die notwendige Beteiligung eines Flavins dürfen allerdings nur sehr vorsichtig gezogen werden (WALSH, pers. Mitteilung). Während mit Rhein keine Inhibierung der STOX-Aktivität beobachtet werden konnte, halbierte 1.25 mmol/l Dicoumarol die Enzymaktivität. Äußerst stark inhibierend erwies sich das Pentahydroxyflavon Morin. Eine Konzentration von 0.18 mmol/l dieses Gelbholz-Farbstoffs genügt bereits für eine 50%ige Aktivitätsminderung, was in der Größenordnung der Hemmkon-

zentration für andere Oxidasen liegt (ILO et al., 1985). Tabelle 10 faßt noch einmal alle Verbindungen zusammen, welche auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber STOX getestet wurden.

Verbindung	Konzentration [mmol/l]	Hemmung [%]
Jatrorrhizin	0.35	33
Berberin	0.35	30
(R)-Norretikulin	0.10	50
H ₂ O ₂	0.30	50
Dicoumarol	1.25	50
Morin	0.18	50
Pentandion	0.10	50
Na ₂ EDTA	10	0
1,10-Phenanthrolin	10	0
KCN	22	0
NaN ₃	40	0
Jodacetamid	0.5	0
N-Äthylmaleinimid	0.5	0
p-Hydroxymercuri- benzoesäure	0.5	0
5,5'-Dithiobis-(2- nitrobenzoesäure)	0.5	0
Jodosobenzoesäure	0.5	0

Tabelle 10 Zusammenfassende Übersicht über die Hemmbarkeit von STOX mit verschiedenen Verbindungen. Die Messungen erfolgten jeweils im Standardtest bei den angegebenen Substanzkonzentrationen.

3.13 Multiple Enzymformen

Verfeinerte Nachweismethoden zeigen immer häufiger, daß viele Enzyme in einem Organismus in geringfügig verschiedenen Formen vorliegen können. Ein gutes Beispiel aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel sind die von U. PFITZNER (1984) beschriebenen Strictosidin-Synthasen aus Catharanthus roseus. Ein einfacher Versuch zeigte, daß es mindestens drei Proteine gibt, welche die für STOX typische Oxidation durchführen können. Da die genomische Analyse der STOX-Aktivitäten noch aussteht, soll der Terminus "Isoenzym" vorerst nur unter Vorbehalt gebraucht werden. Der Versuch bestand darin, einen unfraktionierten Rohextrakt nach Ammoniumsulfat-Fällung und Entsalzung (72 pkat/ml; 2.86 mg/ml Protein) elektrophoretisch aufzutrennen (7.5% Acrylamid) und die STOX-Aktivität durch Inkubation des Gels in verschiedenen Substratlösungen ((S)-Norretikulin, (S)-Retikulin, (S)-Scoulerin) zu identifizieren (vgl. III. 2.4). Neben einer orange fluoreszierenden Doppelbande bei Rf 0.6 war noch eine weitere Aktivität bei einem Rf-Wert von 0.4 auszumachen. Erstere Aktivität wurde im vorangehenden (III. 2.3) bereits ausführlich dargestellt. Die Enzyme zeigen dieselbe Größe, lassen sich über Gelfiltration (Ultrogel AcA 44, TSK G 3000 SW), Dye-ligand Chromatographie und Ionenaustausch-Chromatographie nicht voneinander trennen. Mit ihrer nur gering unterschiedlichen freien Mobilität in der Elektrophorese (Ferguson plot - Abbildung 12 in III. 2.5) zeigen sie ein charakteristisches Merkmal von Isoenzymen (HAMES und RICKWOOD, 1981). Zur Analyse der elektrophoretisch weniger mobilen Aktivität (Rf = 0.4; siehe oben) wurde ein - wie beschrieben - bereiteter Rohextrakt (vgl. II. 2.5) von Berberis wilsoniae var. subcaulialata (547 g) durch dreimaliges Aufgeben auf eine XAD 2-Säule (20.3 cm² x 6.5 cm) von störenden niedermolekularen Stoffen befreit und mit 50 ml DEAE-Sepharcel 2.5 h inkubiert (Batch-Verfahren). In einer Säule wurde das Gel anschließend mit einem KCl-Gradienten (0.1 - 0.3 mol/l KCl in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.6) eluiert und die Fraktionen (6 ml) auf STOX-Aktivität getestet. Wie Abbildung 32 zeigt, läßt sich die Hauptaktivität im Bereich von

0.2 mol/l KCl von der Säule desorbieren, was der bereits beschriebenen Aktivität entspricht (vgl. II. 2.7 ff.). Eine weitere geringe STOX-Aktivität (5% der Gesamtaktivität) konnte bereits mit geringen Salzkonzentrationen von der Säule gelöst werden. Gelchromatographisch erwies sich diese Nebenaktivität identisch mit der in Kapitel III. 2.1 (Abbildung 10) dargestellten Nebenaktivität geringeren Molekulargewichts. Wie die genauere Bestimmung mittels Gel-permeations-Chromatographie zeigte, besitzt diese STOX-Aktivität ein Molekulargewicht von $45 \text{ kD} \pm 9\%$. Ihr Substratspektrum erstreckt sich ebenfalls (S)-spezifisch auf Alkaloide vom Typ der 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine. Hinsichtlich des Temperatur-Optimums (ca. 40°C) und des pH-Optimums (8.9) zeigen beide STOX-Aktivitäten (45 kD, 105 kD) vollkommene Übereinstimmung. Ob darüber hinaus auch gemeinsame Strukturelemente vorhanden sind, wurde immunologisch mit Antikörpern untersucht, welche gegen die gereinigte native (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (105 kD) gewonnen worden waren (vgl. II. 7.1). Dazu wurde das fraktionierte Eluat des Ionenaustauschers (s.o.) mit KCl-freiem Elutionspuffer auf einen Proteingehalt von $100 \mu\text{g/ml}$ verdünnt und je $100 \mu\text{l}$ an einen Nitrozellulosefilter gebunden. Durchgeführt wurde das Immunoblotting mit dem Minifold SRC - 96 von Schleicher und Schüll nach dem in II. 7.6 beschriebenen Protokoll. Die Visualisierung der Antikörper, welche antigene Determinanten der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase erkennen, erfolgte nach Vorinkubation mit Peroxydase-markiertem Protein A mittels Diaminobenzidin/ H_2O_2 . Mit beiden STOX-Aktivitäten ergab sich eine positive Nachweisreaktion (Abbildung 32). Die immunologische Kreuzreaktion beider Proteine zeigt, daß über die funktionellen Ähnlichkeiten hinaus beide Aktivitäten auch strukturell über gemeinsame Bereiche verfügen. Der quantitative Beitrag des 45 kD STOX-Protein zur Gesamt-(S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität der Berberis wilsoniae Zellen beisteuert, beträgt 5%. Wie weit dieser Befund auf andere Berberis Arten oder Pflanzenfamilien übertragbar ist und ob in allen Entwicklungsstadien das Verhältnis beider Aktivitäten konstant bleibt, kann nicht gesagt werden.

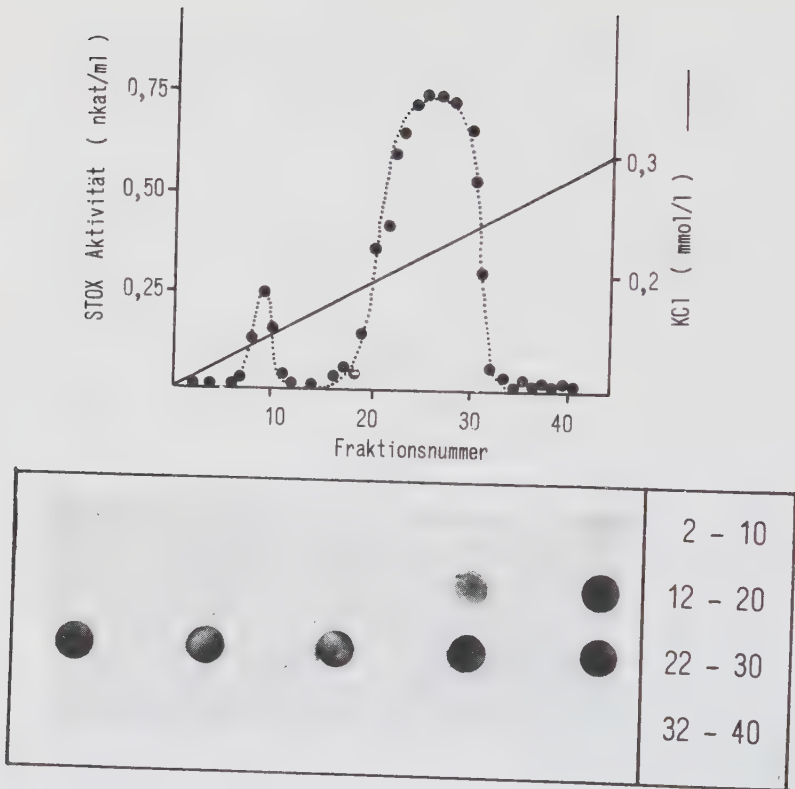


Abbildung 32

(A) Identifizierung zweier STOX-Aktivitäten im Eluat einer Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephacel. Der Ionenaustauscher war mit einem unfractionierten Proteinrohextrakt aus *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* beladen worden. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten (0.1 - 0.3 mol/l) in Aufschlußpuffer. STOX-Aktivität wurde im optischen Standardtest bestimmt.

(B) Immunoblotting der 6 ml Fraktionen mit Antikörpern, welche über das gereinigte STOX der Hauptaktivität (105 kD) gewonnen wurden. Die Visualisierung erfolgte mit Diaminobenzidin/ H_2O_2 (vgl. II. 7.6). Der Antikörper erkennt beide STOX-Aktivitäten.

4. Vorkommen der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX)

Die Frage nach dem Vorkommen der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wurde unter verschiedenen Gesichtspunkten bearbeitet. Zunächst wurden Vertreter verschiedener Pflanzenfamilien, in welchen Protoberberine beschrieben waren, in Form differenzierter Pflanzen oder Zellsuspensionskulturen auf ihren Gehalt an STOX analysiert, also die taxonomische Verbreitung des Enzyms untersucht. Da sich Enzympräparationen am vorteilhaftesten aus Zellsuspensionskulturen gewinnen lassen und viele Enzyme in verschiedenen Stadien der Wachstumskurve eine recht unterschiedliche Aktivität zeigen, wurde der zeitliche Aspekt der Eingangsfrage durch Aufnahmen einer Kinetik des STOX-Aktivitätspegels erfaßt. Schließlich wurde in einem cytologischen Ansatz das Vorkommen der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase auf subzellulärem Niveau untersucht.

4.1 Taxonomische Verbreitung

4.1.1 Nachweis der STOX-Aktivität in Rohextrakten

Protoberberine sind bislang in 9 verschiedenen Familien des Pflanzenreichs gefunden worden (CORDELL, 1981). Der Nachweis der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität in verschiedenen Pflanzenfamilien, in welchen Protoberberine gefunden wurden, wäre daher ein wichtiger Hinweis auf die Beteiligung des Enzyms an der Biosynthese der Protoberberin-Alkaloide.

Proteinextrakte aus differenzierten Pflanzen wurden - wie unter II. 5.1 beschrieben - hergestellt und im Standardtest (optisch oder ^3H -Ausbau; III. 1.1, 1.4) auf STOX-Aktivität untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. In allen getesteten Familien, für welche das Vorkommen von Protoberberinen beschrieben wurde, konnte STOX nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die STOX-Aktivität nicht gleichmäßig über alle Pflanzen-

Pflanzenart	Enzym-Aktivität	
	pkat/mg Protein	pkat/g Trocken- gewicht
Berberidaceae		
Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.		
- Blätter	4.1	120
- Wurzel	20.0	350
Annonaceae		
Annona reticulata L.	15.1	305
Papaveraceae		
Papaver somniferum L.		
- Blätter	0.7	63
- Wurzel	5.0	192
Chelidonium majus L.	1.8	85
Corydalis cava Schweigg, Körte	0.7	60
Eschscholzia lobbii Greene	1.8	31
Fumariaceae		
Fumaria parviflora Lam.	5.3	102
Solanaceae		
Nicotiana tabacum L.	0	0
Apocynaceae		
Catharanthus roseus (L.) G.Don	0	0

Tabelle 11 (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität in Rohextrakten differenzierter Pflanzen. Der Nachweis erfolgte im Standardtest (III. 1.1, 1.4)

organe verteilt. So korreliert im Falle der Berberitze die gegenüber den Blättern in der Wurzel höhere STOX-Aktivität mit den für die Wurzeln beschriebenen höheren Protoberberingehalten, welche diesem Pflanzenteil seine gelbe Farbe verleihen. Auch im Schlafmohn finden sich in den unterirdischen Pflanzenteilen höhere Enzym-Aktivitäten als in den grünen Teilen. Die Rolle des Milchröhrchen-Systems dieser Pflanze war von hohem Interesse, da der Alkaloidgehalt dieser zellulären Struktur von alters her bekannt ist und der Milchsaft eine hohe biosynthetische Aktivität zeigt (FAIRBAIRN und STEELE, 1981). Eine Quantifizierung der STOX-Aktivität im Latex war, was den ^3H -Ausbautest anbelangt, durch den hohen endogenen Retikulinpool (WIECZOREK, 1984) erschwert, hinsichtlich des optischen Tests durch die Latex-eigene milchige Konsistenz schlecht möglich. Qualitativ jedoch konnte zweifelsfrei festgestellt werden, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase im Latex von Papaver somniferum L. aktiv ist. Die Latexpräparation erfolgte durch Verdünnung des Milchsafts (1 + 1) mit 0.5 mol/l Mannit in 0.1 mol/l Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0, wie sie von ROBERTS et al. (1983) beschrieben wurde. Signifikant erhöhte STOX-Aktivitäten (Faktor 2) ließen sich nach Ultraschallung der Latexpräparation messen.

Gegenüber den beispielsweise oft xeromorphen Berberis-Arten ist die Präparation von Proteinextrakten aus pflanzlichen Zellkulturen wesentlich einfacher zu bewerkstelligen. Zur Gewinnung von Enzym-Präparationen waren Zellsuspensionskulturen 7 Tage lang unter den in II. 1.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert und - wie in II. 5.2 ausgeführt - aufgeschlossen worden. Die STOX-Aktivität wurde im Standardtest gemessen. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis. Bis auf die beiden Gewebe, für welche keine Benzyloisochinoline bekannt sind (Catharanthus roseus, Nicotiana tabacum), zeigten die Vertreter aller vier getesteten Familien STOX-Aktivität. Dieser Befund legt eine kausale Korrelation zwischen der gemessenen Enzym-Aktivität und dem Auftreten von Protoberberin-Alkaloiden nahe.

Zellkultur	pkat/mg Protein	nkat/l Medium
Berberidaceae		
Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.	25	36
Berberis stolonifera Koehne und Wolf	24	32
Berberis beaniana Schneid.	15	24
Berberis aristata DC	14	18
Berberis aggregata Schneid.	14	21
Menispermaceae		
Cissampelos mucronata R. Rich	25	21
Papaveraceae		
Eschscholzia californica Cham.	9	4
Argemone platyceras Link et Otto	6	1.7
Papaver somniferum L.	1	2.1
Ranunculaceae		
Thalictrum glaucum Desf.	6	2.1
Thalictrum foetidum L.	4	2.0
Thalictrum flavum L.	3	1.8
Thalictrum dipterocarpum Franch.	2	1.5
Apocynaceae		
Catharanthus roseus (L.) G.Don	0	0
Solanaceae		
Nicotiana tabacum L.	0	0

Tabelle 12 Spezifische Enzym-Aktivitäten der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase in Rohextrakten verschiedener Zellsuspensionskulturen. Der Nachweis erfolgte im Standardtest (III. 1.1, 1.4)

4.1.2 Immunologischer Nachweis des STOX-Proteins

Die weite Verbreitung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität über viele Pflanzenfamilien wirft natürlich die Frage auf, inwieweit diese STOX-Aktivitäten - auf die Proteinstruktur bezogen - verwandt sind. Vorstellbar wäre es, daß essentielle Strukturen des STOX-Proteins konserviert wären, während weniger wichtige Bereiche bei vergleichender Betrachtung Heterogenität zeigen. Hinweis auf gemeinsame Strukturelemente von Antigenen gibt die Ausbildung eines Antigen /Antikörper-Komplexes unter Verwendung geeigneter Antikörper. Die einfachste Möglichkeit, diese Komplexbildung zu studieren, stellt die Technik der radialen Immundiffusion dar, bei welcher die Ausbildung eines Präzipitats ohne Vortrennung des Antigens erfolgt.

Die Antikörper waren aus Kaninchenseren - wie beschrieben (II. 7.2) - gereinigt worden und mit Kaliumphosphat-Puffer (10 mmol/l pH 7.4) auf einen Proteingehalt von 1.0 mg/ml verdünnt worden. Als Antigenlösung dienten Rohextrakte verschiedener Zellsuspensionskulturen. Da nur kleine Proteinmengen (< 0.1 mg) benötigt wurden, wurde der Zellaufschluß in einem Eppendorfgefäß mit ca. 0.5 g Gewebe nach der in II. 5.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Anstelle der Mullfiltration konnte einfach abzentrifugiert werden. Die Mikrorohextrakte wurden auf einen Proteingehalt von 0.3 mg/ml eingestellt und im Ouchterlonytest (15 µl Rohextrakt, 10 µl Antikörper) wie beschrieben (III. 7.3) getestet. Tabelle 13 zeigt die Liste der getesteten Zellextrakte. Wie Kontrollversuche mit Antigen-/Antikörper-Verdünnungsreihen bestätigten, konnte die Ausbildung von Präzipitaten nur in der Gattung Berberis beobachtet werden. Ursache für die fehlende Präzipitatabildung mit den Proteinextrakten der anderen Pflanzenfamilien können in der immunologischen Verschiedenheit, oder auch in der zu geringen Konzentration der jeweiligen STOX-Proteine gesehen werden. Das erhaltene Ergebnis legt jedoch nahe, daß es immunologische Unterschiede von STOX-Proteinen verschiedener Pflanzenfamilien gibt.

Zellkultur	Präzipitat
Papaveraceae	
Papaver somniferum L.	-
Eschscholzia lobbii Green	-
Glaucium rubrum Sibth et Sm.	-
Berberidaceae	
Berberis aristata DC	+
Berberis notabilis Schneid.	+
Berberis gagnepainii Schneid.	+
Berberis canadensis Mill (Pursh.)	+
Berberis stolonifera Koehne und Wolf	+
Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.	+
Berberis aggregata Schneid.	+
Ranunculaceae	
Thalictrum flavum L.	-
Thalictrum dipterocarpum Franch.	-
Ranunculus mannii L.	-
Menispermaceae	
Stephania delavayi Diels.	-
Cissampelos mucronata R. Rich	-
Chasmanthera dependens Hochst	-

Tabelle 13 Immunpräzipitatbildung verschiedener STOX-haltiger Rohextrakte mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern, welche gegen STOX gerichtet waren (Ouchterlony-Test).

Zur Ausbildung des sichtbaren Immunpräzipitats war es unabdingbare Voraussetzung, daß das STOX-Protein über mehrere antigene Determinanten verfügte und die verwendete Antikörperpräparation mehrere Immunglobuline verschiedener Spezifitäten enthielt. Die Gemeinsamkeit einer noch so typischen Oberflächenstruktur allein hätte nicht ausgereicht, ein Präzipitat zu bilden. Verzichtet man auf die Immunpräzipitation und weist stattdessen lediglich die Bindung eines Antikörpers an das STOX-Protein nach, so genügen für einen positiven Nachweis bereits eine antigene Determinante am Protein und ein Antikörper, welcher diese erkennt. Die Bindung eines unspezifischen Antikörpers an das Protein kann allerdings leicht zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Eine hohe Nachweisempfindlichkeit dieser Immundetektion wird durch die Markierung der gebundenen Antikörper mit (^{125}J)-markiertem Staphylococcus aureus-Protein A erreicht. Mittels dieser Immunoblotting-Technik sollte zusätzlich zu der taxonomischen Verbreitung der STOX-Aktivität (III. 4.1.1) die Verbreitung der Identität des Proteins gemessen werden.

Zur Abschätzung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden die aus verschiedenen Kaninchenimmunisierungen gewonnenen (II. 7.1) und aufgereinigten Seren (II. 7.2) untereinander verglichen, um die geeignetste Antikörperpräparation zu bestimmen. Dazu wurde ein Standard-Rohextrakt aus Berberis wilsoniae var. subcaulialata-Zellkultur (Präparation vgl. II. 5.2; Proteingehalt 0.65 mg/ml) unter denaturierenden Bedingungen (12.5%iges Polyacrylamidgel, II. 15.2) auf einem 1 mm Vertikalfachgel aufgetrennt (26 µg Protein pro Geltasche; 8 gleiche Proben), auf Nitrocellulose geblottet (II. 7.6) und die Proteinbanden mit Amidoschwarz angefärbt. Der Filter wurde den 8 Bahnen entsprechend mit einer Rasierklinge und Schneidschablone (Schleicher und Schüll) zerteilt, und jeder Streifen gemäß dem in II. 7.6 angegebenen Immunoblotting-Protokoll unter Verwendung der verschiedenen Antikörperpräparationen (1.2 µg Antikörper pro ml) behandelt und autoradiographisch ausgewertet (Ex-

position: 10 Tage Raumtemperatur). Das Ergebnis bei Verwendung eines spezifischen und einer weniger spezifischen Antikörperpräparation zeigt Abbildung 33. Für alle weiteren

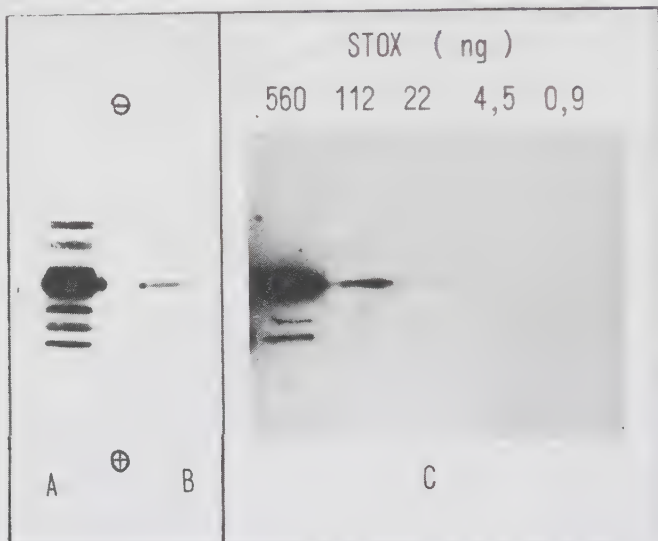


Abbildung 33

Autoradiographie eines Immunoblots des über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Rohextrakts von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* unter Verwendung verschiedener Antikörper-Präparationen. Während das in Bahn (A) verwendete Serum mit sehr vielen Proteinen kreuzreagiert, zeigt das in (B) benutzte Serum nur schwache Kreuzreaktionen. Die in (B) verwendeten Antikörper wurden für alle angegebenen Zwecke verwendet. (C) Ermittlung der Nachweisgrenze des Immunoblotting-Verfahrens nach Auftrennung (SDS-Polyacrylamidgel) elektrophoretisch sauberen STOX-Proteins (560 - 0.9 ng). Die Nachweisgrenze für STOX nach Autoradiographie liegt bei 4.5 ng.

Versuche wurde die Antikörperpräparation verwendet, welche die geringste Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen des elektrophoretisch aufgetrennten Rohextrakts zeigte. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens sollte mit reinem STOX bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Mengen elektrophoretisch sauberen Enzyms (1120 - 1 ng) genauso wie für die oben beschriebenen Rohextrakte aufgetrennt und immunologisch detektiert. 4.5 ng STOX ergaben einen gerade noch

sichtbaren Kontrast auf dem Röntgenfilm und stellen damit die Nachweisgrenze dieses STOX-Nachweisverfahrens dar (Abb. 33). Da eine einfache immunologische STOX-Nachweismethode entwickelt werden sollte, war dieses Verfahren jedoch technisch zu aufwendig, da pro Versuch jeweils nur eine geringe Anzahl von Proben in einer viertelstündigen Prozedur aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet werden kann. Es wurde daher versucht, die Immunoblotting-Technik ohne Vortrennung der Rohextrakte durchzuführen. Die Proteinextrakte sollten dazu direkt auf die Nitrozellulose aufgebracht werden, um sie dann nach dem gleichen Protokoll (II. 7.6) auf STOX-Anwesenheit immunologisch zu testen.

Die Art der Probenvorbereitung war für das Versuchsergebnis nicht unwesentlich. So zeigte sich, daß die Menge an gebundenem Antikörper unter denaturierenden Bedingungen signifikant geringer war als unter nativen Bedingungen. Die qualitative Abschätzung der gebundenen Antikörpermenge erfolgte aus dem Schwärzungsgrad der Autoradiogramme. Die zeitaufwendige Exposition der Röntgenfilme durch Verwendung von Peroxidase-markiertem Protein A abzukürzen, erwies sich als impraktikabel, da die durch Chlorophyll, Protoberberin-Alkaloide oder andere Sekundärstoffe bedingte, oft kräftige Färbung der Rohextrakte mit dem peroxidativ gebildeten Farbstoff interferierte.

Da die verwendete Antikörperpräparation geringe Kreuzreaktionen mit Nicht-STOX-Proteinen zeigte (Abbildung 33), wurde versucht, die beobachtete unspezifische Bindung durch Verdünnung der Rohextrakte unter die Nachweisgrenze zu drücken. Zur Abschätzung der notwendigen Verdünnung wurde ein Gewebe mit hohem STOX-Gehalt (Berberis wilsoniae var. subcaulialata) mit einem STOX-freien Gewebe (Catharanthus roseus) verglichen. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Standardrohextrakten beider Gewebe (vgl. II. 5.2 - mit Aufschlußpuffer auf einen Proteingehalt von 0.6 mg/ml verdünnt) mit einer Minifold SRC 96-Apparatur, wie in II. 7.6 beschrieben, durch Nitrozellulosefilter gesaugt. Die Proteinmengen reichten von 7.5 µg bis 7 ng. Der immunologische Nachweis erfolgte nach dem Standardprotokoll (II. 7.6.). Wie Abbildung 34 zeigt, würden beide Gewebe,

solange viel Protein verwendet wurde, als STOX-positiv bezeichnet werden. Erst die Verdünnung läßt die deutlichen Unterschiede sichtbar werden. Bis etwa 0.47 µg Protein zeigt sich noch ein unspezifisches Signal. Erst bei weiterer Verdünnung, welche noch um einen Faktor 70 möglich ist, zeigt nur noch das STOX-haltige Berberis-Protein einen positiven STOX-Nachweis. Der Rohextrakt mußte also, um unspezifische Reaktionen auszuschließen, in diesem Fall um einen Faktor 250 verdünnt werden.

Vergleicht man in dieser Technik zwei STOX-haltige Rohextrakte, so weist derjenige Extrakt den höheren STOX-Gehalt auf, welcher bei höherer Verdünnung noch über eine ausreichende Antikörper-Bindung auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. In einer geometrischen Verdünnungsreihe gleich konzentrierter Rohextrakte (0.2 mg/ml Protein) aus Blatt- und Wurzelgewebe von Berberis wilsoniae var. subcaulialata konnte somit der höhere STOX-Gehalt der Wurzeln bestätigt werden (Abbildung 34).

Die einfache Kultivierung pflanzlichen Gewebes in Zellkultur macht es in der Regel möglich, genügend Material (5 - 10g) zur direkten Messung einer Enzym-Aktivität zur Verfügung zu haben. Als problematischer Engpaß erweist sich dagegen oft die begrenzte Verfügbarkeit differenzierter Pflanzenmaterials. Unter dieser Blickrichtung sollte der immunologische STOX-Nachweis versucht werden. Zur Beurteilung der Aussagekraft der Immunoblotting-Technik wurden daher Pflanzenteile einiger STOX-haltiger Pflanzengattungen (Berberis, Papaver) und STOX-freier Familien aus den unterschiedlichsten Pflanzengruppen getestet. Die Mikroaufschlüsse erfolgten wie in II. 5.2 beschrieben. Pro Gewebe wurden 10 µg Protein an Nitrozellulose - wie beschrieben - adsorbiert und STOX immunologisch nachgewiesen. Abbildung 35 zeigt das Autoradiogramm. Eine deutliche Schwärzung des Röntgenfilms bestätigte klar die STOX-Anwesenheit in Blättern von Berberis wilsoniae var. subcaulialata. Will man die Blattfläche angeben, welche benötigt

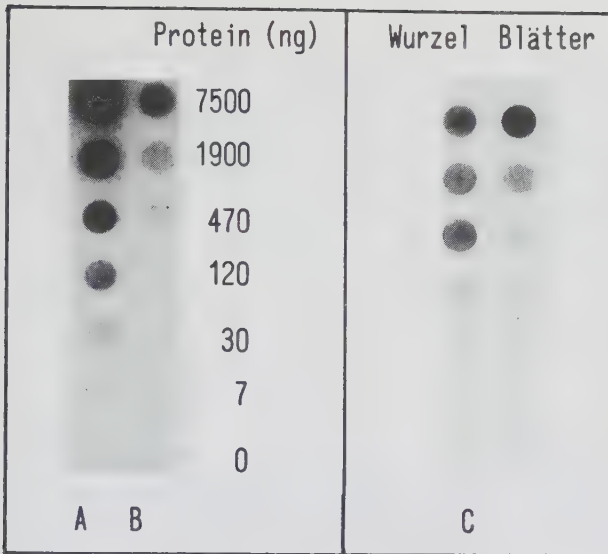


Abbildung 34

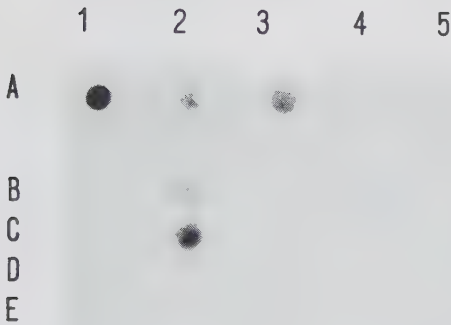
Immunoblotting einer Verdünnungsreihe (7 - 7500 ng Protein) von Rohextrakten eines STOX-haltigen Gewebes (A) Berberis wilsoniae var. subcaulialata und eines STOX-freien Kontrollgewebes (B) Catharanthus roseus. Bis 470 ng Protein ist noch eine unspezifische Nachweisreaktion sichtbar. (C) Geometrische Verdünnungsreihe (1 : 2; erste Probe 10 µg Protein) von gleich konzentriertem Blatt- und Wurzelextrakt einer differenzierten 2jährigen Pflanze von Berberis wilsoniae var. subcaulialata. Die Wurzelproben zeigen bei höherer Verdünnung noch einen positiven STOX-Nachweis.

wird, um in diesem Fall den positiven STOX-Nachweis führen zu können, ergibt sich eine Fläche von ca. 10 mm^2 ($11 \text{ } \mu\text{l}$ eines 0.5 ml -Extrakts aus 4.7 cm^2 Blattfläche). Während sich für die meisten Gewebe die STOX-Abwesenheit bestätigen ließ, zeigten doch zwei Extrakte eine deutliche Schwärzung (Piper nigrum, Nauclea latifolia; B2, C2 in Abbildung 35). Die Kreuzreaktivität dieser STOX-freien Rohextrakte zeigt, daß man positive Blot-Resultate nicht uneingeschränkt als positiven STOX-Nachweis interpretieren darf. Bestätigt wurde dieser Befund in einer genau gleich durchgeführten Testreihe mit 85 pflanzlichen Zellkulturen. Es wurde kein Fall beobachtet, in welchem ein STOX-haltiges Gewebe immunologisch STOX-negativ gewesen wäre. Umgekehrt aber wurden einige falsch positive Resultate erhalten. Die Methode scheint daher sehr gut geeignet, eine große Zahl unterschiedlichster Pflanzen relativ schnell mit geringem Materialverbrauch auf das Vorhandensein von STOX hin zu testen. Zur Feinanalyse sollte aber das Immunoblotting nur in Kombination mit einer vorangehenden elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgen. Der sichere immunologische STOX-Nachweis muß also in einer zweistufigen Strategie geführt werden, wie sie auch in der klinischen Chemie bei vergleichbarer Problemstellung erfolgreich angewendet wurde (KURTH *et al.*, 1984).

Ein immunologischer Nachweis läßt sich solange führen, als die dreidimensionale antigene Struktur, welche der Antikörper erkennt, noch vorliegt. So ließen sich noch 6 Opium-Alkaloide immunologisch in einer Papaver somniferum-Pflanze nachweisen, welche vor über 200 Jahren herbarisiert worden war (WIECZOREK, 1984). Ob dies auch für an der Biosynthese beteiligte Enzyme noch möglich ist, sollte untersucht werden. Dazu wurden 20 - 100 mg trockenen Herbarmaterials in flüssigem Stickstoff eingefroren, zu Pulver verrieben und mit 0.5 ml Puffer (Tris/HCl 10 mmol/l , pH 7.6) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das rehydratisierte Material wurde nach Zugabe weiterer 0.5 ml Puffer noch einmal in flüssigem Stickstoff eingefroren (im Eppendorfgefäß) und

Abbildung 35

Autoradiogramm eines Immunoblots von Blättern STOX-haltiger (A 1 - 5) und STOX-freier differenzierter Pflanzen (B 1 - E 5). Die aufgetragenen Proteinmengen betrugen 10 µg (Ausnahme: A 4, A 5 mit 2.5 µg). Nähere Ausführung im Text. Nachstehende Liste führt die verwendeten Pflanzen und zugehörigen Familien auf.



siehe Fortsetzung

Fortsetzung

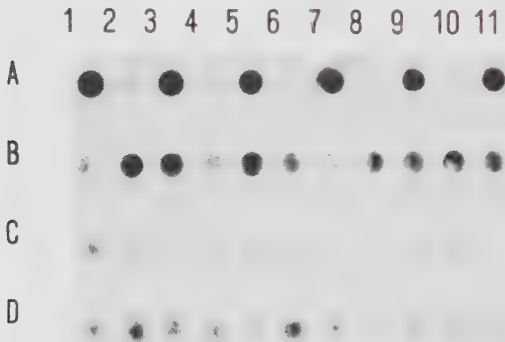
Pflanzenart	Familie
A 1/4 Berberis wilsoniae var. subcaulialata	Berberidaceae
A 2/5 Papaver somniferum	Papaveraceae
A 3 Berberis aristata	Berberidaceae
B 1 Euphorbia aphylla	Euphorbiaceae
B 2 Piper nigrum	Piperaceae
B 3 Pandanus veitchii	Pandanaceae
B 4 Cibotium menziesii	Cyatheaceae
B 5 Deriopteris palmata	Sinopteridaceae
C 1 Sphaeropteris cooperi	Cyatheaceae
C 2 Nauclea latifolia	Rubiaceae
C 3 Phalaenopsis spec.	Orchidaceae
C 4 Phajus mishmicus	Orchidaceae
C 5 Selaginella viticulosa	Selaginellaceae
D 1 Araucaria excelsa	Araucariaceae
D 2 Picea abies	Pinaceae
D 3 Abies alba	Pinaceae
D 4 Narcissus "King Alfred"	Amaryllidaceae
D 5 Taraxacum officinalis	Cichoriaceae
E 1 Lonicera salicifolia	Caprifoliaceae
E 2 Olea europea	Oleaceae
E 3 Polygonum tinctorum	Polygonaceae
E 4 Brassica capitata	Brassicaceae
E 5 Solanum lasiocarpum	Solanaceae

unter Schütteln aufgetaut (Eppendorfschüttler, 30 Min., Raumtemperatur). Der Extrakt wurde abzentrifugiert (5 Min. Eppendorfszentrifuge) und der Proteingehalt im Überstand bestimmt. Je 10 µg Protein wurden - wie beschrieben - an Nitrozellulose gebunden und auf STOX-Antigene immunologisch getestet. Abbildung 36 zeigt das Autoradiogramm. Als positive Kontrolle diente eine vergleichbare Präparation frischer Blätter von Berberis wilsoniae var. sub-caulialata, als negative Kontrolle Herbarmaterial des Immergrünengewächses Rhazia stricta. Während viele Proben nur schwach positiv sind, zeigen einige einen deutlichen Hinweis auf STOX. So ist das eindeutig positiv getestete Herbarmaterial von Berberis buxifolia Lam. annähernd 100 Jahre alt. Eine Verdünnungsreihe dieses Extraktes (10-1 µg) erhärtete den positiven Befund. In einigen Fällen ist es also möglich, STOX selbst in historischem Pflanzenmaterial nachzuweisen.

Abbildung 36

Autoradiographie eines STOX-Immunoblots mit Herbarmaterial. Die Präparation der Antigenextrakte ist im Text genau beschrieben. Als positive Kontrolle dienten verschiedene Proteinmengen einer Präparation von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* (A 1,3,5,7,9,11 mit 80,40,20,10,5,2.5 µg Protein). Negativkontrolle: *Rhazia stricta* (A 2,4,6,8,10 mit 40,20,10,5 µg Protein). Die Herbarextrakte enthielten je 10 µg Protein.

Pflanzenart und Bezeichnung der Herbarbögen aus der Botanischen Staatssammlung, München, sind nachstehend aufgelistet.



Pflanzenart		Herbarbogen
B 1	<i>Berberis aggregata</i> Schneid.	Botan. Garten 1975
B 2	<i>Berberis aristata</i> DC	Schäfer 194
B 3	<i>Berberis buxifolia</i> Lam.	Dessauer 1919 (1888)
B 4	<i>Berberis circumserrata</i> C.S.	Botan. Garten 1976
B 5	<i>Berberis darwinii</i> Hook	Junge 41
B 6	<i>Berberis dictyophylla</i> Franch	Botan. Garten 1976
B 7	<i>Berberis empetrifolia</i> Lam.	Grau, 3298
B 8	<i>Berberis grandiflora</i> L.	Wagner 24 (1859)

siehe Fortsetzung

Fortsetzung

	Pflanzenart	Herbarbogen
B 9	<i>Berberis montana</i> L.	Schneider 1904 (1876)
B 10	<i>Berberis vulgaris</i> ssp. <i>orientalis</i> Schneid.	Vasák 1974
B 11	<i>Berberis schwerinii</i> Schneid.	Schimpf 845
C 1	<i>Berberis tinctoria</i> Leschen	Hohenacker 1126
C 2	<i>Berberis vulgaris</i> L.	Dilmer 1579
C 3	<i>Cocculus laurifolius</i> DC.	Loher 12446
C 4	<i>Stephania abyssinica</i> L.	Schlieben 1415
C 5	<i>Stephania hernandifolia</i> Walp	Meebold 2847
C 6	<i>Cissampelos pereira</i> L.	Meebold 11811
C 7	<i>Tinospora caffra</i> Miers	Hemsley 4155
C 8	<i>Annona palustris</i> L.	Urban 918 (1885)
C 9	<i>Thalictrum foetidum</i> L.	Oberwinkler 18670
C 10	<i>Thalictrum flavum</i> L.	Krach TH 30
C 11	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> L.	Maier 1979
D 1	<i>Thalictrum dasycarpum</i> Fisch und Mey	Meebold 9024
D 2	<i>Thalictrum minus</i> L.	Krach TH 80
D 3	<i>Eschscholzia californica</i> Cham.	Urschler 1968
D 4	<i>Chelidonium majus</i> L.	Gröger 163
D 5	<i>Glaucium corniculatum</i> L.	Förster 1885
D 6	<i>Glaucium flavum</i> Crantz	Phitos 720
D 7	<i>Argemone platyceras</i> Link und Otto	Purpus 1110
D 8	<i>Papaver rhoeas</i> L.	Tay 6425
D 9	<i>Papaver somniferum</i> ssp. <i>setigerum</i> CD	Phitos 2335
D 10	<i>Corydalis bulbosa</i> (L.) DC	Pötzl und Dörr 1972
D 11	<i>Fumaria officinalis</i> L.	Gröger 423

4.2 Kinetik des Gehalts an STOX in Zellkultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.

Der optimale Zeitpunkt der Entnahme einer Probe des bestgeeigneten Untersuchungsobjekts ist Grundvoraussetzung für jegliche Enzym-Isolierung. Die hohen STOX-Gehalte der Berberis wilsoniae var. subcaulialata-Zellsuspensionskultur ließen dieses Gewebe als geeignetste Quelle zur Gewinnung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase erscheinen. Die Frage nach dem günstigsten Erntezeitpunkt der Kultur wurde durch eine kinetische Analyse der Zellkultur beantwortet. Da STOX in großen Mengen gewonnen werden sollte, wurde der Versuch in Ferbachkolben wie folgt durchgeführt.

Vier Fernbachkolben mit 750 ml LS-Medium wurden mit je 52 g Zellmaterial inokuliert und unter Standardbedingungen (II. 1.1) kultiviert. Nach unterschiedlicher Wuchsdauer wurden je 15 ml steril entnommen, die Zellen mit Hilfe eines Büchnertrichters vom Medium abgetrennt und mit flüsigem Stickstoff schockgefroren. Aus einem aliquoten Teil der Zellen wurde ein zellfreier Rohextrakt zur Bestimmung der Enzym-Aktivität hergestellt (II. 5.2), ein anderer diente zur Bestimmung des Trockengewichts. Die Ergebnisse der vier Parallelproben wurden gemittelt und sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Enzymaktivität läuft 13 Tage lang parallel der Zunahme des Trockengewichts, um nach einem steilen Anstieg zum Ende der Wachstumsphase drastisch auf den Ausgangswert abzufallen. Als optimaler Erntezeitpunkt wurde der 16. Tag gewählt. Einen vergleichbaren Kurvenverlauf erhielt man, wenn man die Wachstums- und Aktivitätsanalyse in 1 l Erlenmeyerkolben durchführte. Geerntet wurde in letzterem Fall nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen. Die entsprechend der Zellmasse-Zunahme ansteigende STOX-Aktivität läuft in etwa parallel dem zeitlichen Verlauf des Gehalts an oxidierten, gelb gefärbten Protoberberin-Alkaloiden, wie sie bereits 1981 von HINZ und ZENK für verschiedene Zellkulturen beschrieben wurden.

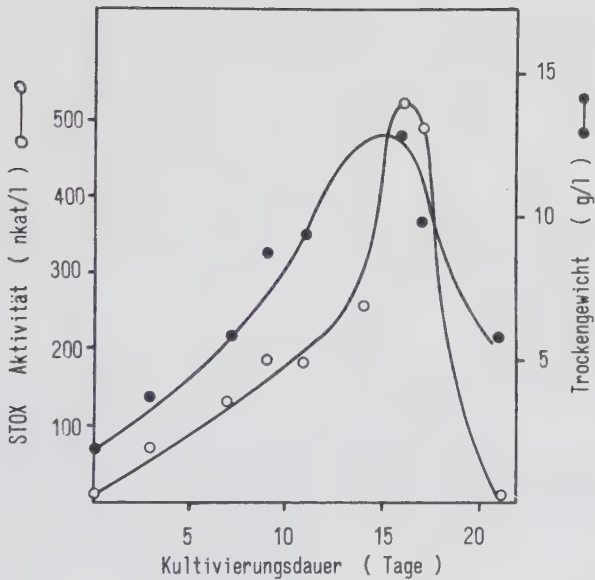


Abbildung 37 Kinetik des Trockengewichtverlaufs und der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität in einer Zellsuspensionskultur von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*. Die Anzucht erfolgte auf einem Rotationsschüttler (100 Upm) in Fernbachkolben (750 ml LS-Medium) unter Standardbedingungen (23°C, 650 Lux Dauerlicht).

4.3 Subzelluläre Kompartimentierung von STOX

Die Betrachtung des zellulären Plasmas als Organellen durchsetzten Lösungsraum für Proteine war für die Enzymologie lange eine akzeptable Approximation. Ein echtes Verständnis für die Feinabstimmung von Stoffwechselwegen und die Signifikanz der am isolierten Enzym gewonnenen Daten läßt sich ausschließlich unter Berücksichtigung der tubulären und vesikulären cytoplasmatischen Matrix erlangen (WESTERHOFF,

1985; MASTERS, 1985). Die zellulären Enzyme lassen sich nach schonender Desintegration der Zelle entsprechend ihrer Dichte grob in zwei Gruppen einteilen. Enzyme, welche die gleiche Dichte wie das gelöste Cytoplasma haben (ca. 1.0 g/cm^3), und solche, welche sich in einem Schwerfeld sedimentieren lassen ($\rho > 1.0 \text{ g/cm}^3$). Liegen die Enzyme dabei in einem Membran-umschlossenen Kompartiment vor (Organellen, Golgi-Vesikel, coated vesicles etc.), spricht man von vesikulären Enzymen, von partikulären Enzymen spricht man, wenn Enzyme sich in hochmolekularer, assoziierter Form (Multi-enzymkomplexe etc.) sedimentieren lassen, oder solange noch keine Evidenz dafür vorliegt, daß die sedimentierbare Enzym-Aktivität in einem Membran-umschlossenen Kompartiment vorliegt. Zur Analyse der strukturellen Organisation der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wurde als erster Schritt das Untersuchungsobjekt, die verwendete Berberis-Zellkultur, auf seine morphologischen Charakteristika hin untersucht. Untersuchungen der Frage, ob die STOX-Aktivität den löslichen oder den partikulären Enzymen zuzurechnen ist, führten zur Isolation und Charakterisierung eines Partikels mit der gesuchten Aktivität. Die im letzten Abschnitt dieses Kapitels beschriebenen Biotransformations-Experimente ergaben schließlich eine erste grobe Modellvorstellung von der ultrastrukturellen Organisation der Protoberberin-Biosynthese.

4.3.1 Ultrastrukturelle Analyse einer Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid. Suspensionskultur

Berberis wilsoniae wächst in Zellsuspensionskultur als Einzelzelle oder in Form kleiner Zellaggregate aus bis zu vier Zellen mit einer dominierenden Hauptvakuole. Mit Ausnahme der Kerntasche bildet das Cytoplasma nur einen schmalen Saum zwischen Zellwand und Zentralvakuole. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ließen sich vor dem Hintergrund einer schwach gelbgrünlich fluoreszierenden Vakuole im Cytoplasma überwiegend winzige (ca. $0.5 \mu\text{m}$), zum Teil größere (bis zu $6 \mu\text{m}$ Durchmesser) fluoreszierende Punkte erkennen.

Die Vakuolen-Fluoreszenz wird durch Protoberberine hervorgerufen. Denkbar war es, daß demnach die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase in der Vakuole lokalisiert ist. Da das Enzym allerdings ein ausgeprägtes pH-Optimum im Alkalischen (pH 8.9) zeigt und sich als ausgesprochen säureempfindlich erwiesen hatte, wurde der pH-Wert der Berberis Vakuolen bestimmt. Dazu wurden 7 Tage alte Berberis wilsoniae-Zellen mehrfach mit Wasser gewaschen und auf einem Filter unter starkem Unterdruck weitestgehend von extrazellulärem Wasser abgetrennt. Das fast trockene Zellmaterial wurde mit Sand in einem Mörser zerrieben und der Säuregrad des austretenden Zellsafts zu pH 5.5 bestimmt. Da die Vakuolen über 90% des Zellvolumens einnehmen, sollte ihre Zusammensetzung weitgehend den pH-Wert des Zellpreßsafts bestimmen. Für den sauren Charakter der Vakuolen spricht auch die gelbe Farbe der Berberis-Zellkulturen, welche von ihrem Hauptalkaloid Jatrorrhizin herrührt. Im Alkalischen würde sich Jatrorrhizin rot verfärben. Letztendlich wurde auch die klassische Vitalfärbung der Zellen durchgeführt. Mit Neutralrot lassen sich die Vakuolen kirschrot anfärben, was unter Berücksichtigung der Farbüberlagerung mit den vakuolären Protoberberinen ebenfalls für einen pH-Wert unter pH 6 spricht. Auch die hellblaue Vakuolenfärbung mit Viktoriablau spricht für einen pH-Wert von 5-6. Damit ist die Vakuole als enzymatischer Reaktionsraum für die bevorzugt im Alkalischen aktive (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wenig wahrscheinlich.

Zur genaueren Abschätzung der Anteile verschiedener cytoplasmatischer Zellstrukturen mußte von lichtmikroskopischer auf elektronenmikroskopische Beobachtung übergegangen werden. Zur Herstellung von Zellpräparaten wurden die sich im Kulturkolben absetzenden Berberis-Zellen in Fixierungspuffer (75 mmol/l Natriumcacodylat, 2 mmol/l $MgCl_2$, pH 7.0) gewaschen und nach Zugaben von frischem Glutardialdehyd (Endkonzentration 2%) 45 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die nun gut sedimentierbaren fixierten Zellen wurden solange mit Fixierungs-Puffer gewaschen (suspendieren, abzentrifu-

gieren, Überstand verwerfen), bis die Waschlösung nicht mehr nach Glutardialdehyd roch. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer frischen OsO_4 -Lösung auf einen Gehalt von 1.5% eingestellt und die dunkel verfärbten Zellen nach 2 h mehrfach mit Wasser gewaschen (Geruchsprobe). Nach Anfärbung der Zellaggregate mit wässrigem Uranyl-magnesiumacetat (1%, 1 h) wurde das Präparat schließlich in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert (wasserfreies Aceton!) und in Standard-Einbettungsmedium aufgenommen (SPURR, 1969, Modifikation A). Das noch flüssige Kunstharz wurde in Gelatine kapseln überführt, beschriftet (Pergamentpapier, Tusche) und bei 70°C ausgehärtet (8 h). Nach Ablösung der Gelatine (heißes Wasser) konnten Schnitte angefertigt werden (Diamantmesser; 50/70 nm Schnittdicke), welche auf zum Teil Kollodium-befilmten Kupfergrids mit Bleicitrat (100 mmol/l pH 12.6) nachkontrastiert wurden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden, wie in Abschnitt II. 8. beschrieben.

Die genauen Anteile der verschiedenen Organelle am Gesamtzellvolumen konnten aus den Aufnahmen halbautomatisch planimetrisch ermittelt werden (MOP AM 02, Kontron). 90% des Zellinhalts entfallen auf die Vakuole. Vom verbleibenden cytoplasmatischen Raum beansprucht der Zellkern alleine bereits 10%. Um ihn herum ist auch der Großteil des Cytoplasmas lokalisiert. Der Rest liegt in einer dünnen Schicht ($0.5\text{ }\mu\text{m}$) zwischen der äußerst dünn ausgebildeten Zellwand ($0.1 - 0.2\text{ }\mu\text{m}$) und dem Tonoplasten. 7% entfallen auf Proplastiden, welche an ihren typischen Stärkekörnern identifiziert werden können (Abbildung 38). Die bohnenförmigen Mitochondrien (4% des Gesamtvolumens) sind vom Cristae-Typ (Abbildung 38 a und b). Die schematische Übersicht (Abbildung 39) faßt die Daten noch einmal zusammen.

Da Vorversuche gezeigt hatten, daß die (S)-Tetrahydroprotoceder-Oxidase durch 2% Glutardialdehyd nicht inaktiviert wird, erschien es möglich, das Enzym cytochemisch in fixiertem Zellmaterial nachzuweisen. Ausgenutzt werden sollte die stöchiometrische, Substrat-abhängige Wasserstoff-

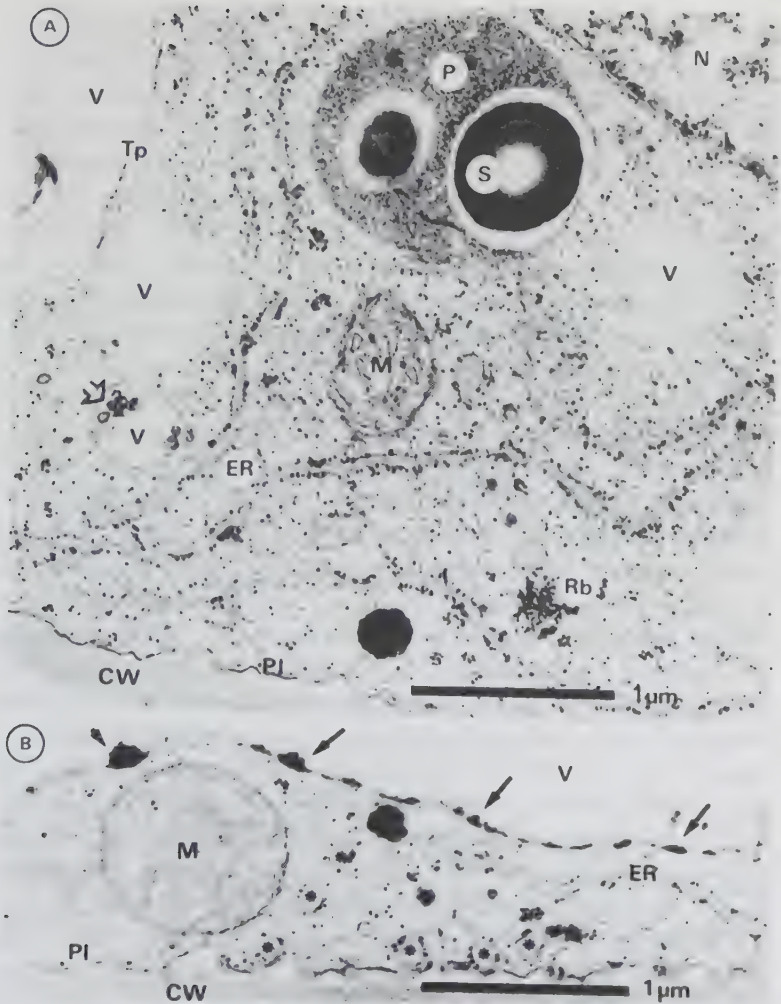


Abbildung 38

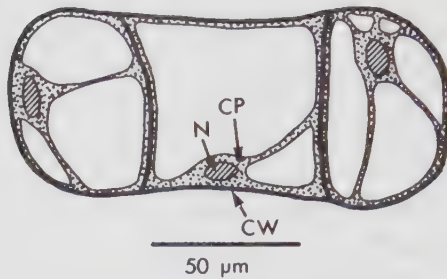
Elektronenmikroskopisches Bild einer Suspensionskultur von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*. Der Großteil des Cytoplasmas ist im Bereich des Zellkerns (N) konzentriert. Proplastiden (P) lassen sich an ihren Stärkekörnern (S) identifizieren. Glatte Vesikel (offener Pfeil in Bild A) liegen oft in kleinen Vakuolen (V). Osmiophile Präzipitate an der vakuolären Seite des Tonoplasten (Pfeile in Bild B) sind für die *Berberis* Zellen typisch. Vesikel des rauen ER (Sterne in Bild B) scheinen mit dem Plasmalemma (PL) zu fusionieren. Zellwand (CW), Ribosomen (Rb), rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien (M).

peroxidbildung durch STOX (III. 3.2 und 3.3), wie sie bereits für andere Oxidasen teilweise erfolgreich ausgenutzt wurde (HUANG et al., 1983). Das enzymatisch gebildete H_2O_2 soll dabei mit Cerionen zu einem Cerperhydroxid reagieren, was sich als elektronendichtes, feines Präzipitat nachweisen läßt. Die Präparation wurde in Anlehnung an das für die pflanzliche Glycolat-Oxidase beschriebene Protokoll durchgeführt (THOMAS und TRELEASE, 1981). Dazu wurde eine 5 Tage alte Zellsuspensionskultur von Berberis wilsoniae var. sub-caulialata in einer Tischzentrifuge bei 1500 Upm 2 Min. sedimentiert, 1 h lang bei 20°C in Fixierpuffer pH 6.8 bei einer Glutaraldehyd-Konzentration von 3% stengelassen und bis zur Geruchsfreiheit mit Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Inkubationspuffer (75 mmol/l Tris-Puffer pH 9.0) aufgenommen und mit 10 mmol/l $CeCl_3$ und 10 mmol/l Aminotriazol 15 Min. vorinkubiert. Da letztere Verbindung als potenter Katalaseinhibitor gilt, sollte damit sichergestellt werden, daß kein enzymatischer Abbau von H_2O_2 erfolgt, was ja die Ausbildung des Cerperhydroxidpräzipitats unmöglich machen würde. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe eines gut löslichen STOX-Substrats gestartet ((S)-Retikulin; Endkonzentration 10 mmol/l in 3 ml Gesamtvolumen). Kontrollansätze ohne $CeCl_3$, Aminotriazol bzw. (S)-Retikulin, sowie zusätzlich mit dem starken STOX-Inhibitor Acetylaceton (50 mmol/l, vgl. III. 3.12) ceteris paribus wurden gemacht. Nach 90 Min. wurden die Zellen (2 ml) in Fixierungspuffer gewaschen, mit 1.6% OsO_4 (in 42 mmol/l Cacodylatpuffer pH 6.8 mit 0.3 mmol/l $MgCl_2$) gefärbt (2 h) und mit Wasser gewaschen. Die Weiterbehandlung bis zum elektronenmikroskopischen Bild erfolgte wie oben ausgeführt. Es ließen sich jedoch keine genügend kontrastreichen Präzipitate darstellen, was eine eindeutige subzelluläre Lokalisation von STOX über die $CeCl_3$ -Technik unmöglich machte.

Da die störende Interferenz einer Katalase naheliegend war, wurde die cytochemische Lokalisation der Berberis-Katalase versucht. Der klassische Katalase-Nachweis erfolgt unter

Ausnutzung der Peroxydase-Aktivität der Katalase, die 3,3'-Diaminobenzidin mit H_2O_2 zu einer zyklisierten, in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlöslichen Form oxidieren kann, welches mit Osmiumradikalen zum elektronendichten "Osmiumschwarz" reagiert. Der Nachweis erfolgte in der von VIGIL (1969) beschriebenen Weise, allerdings bei Raumtemperatur und pH 9.0. Die wie oben vorbehandelten und fixierten Berberis-Zellen wurden im beschriebenen Inkubationspuffer 15 Min. bei Raumtemperatur mit 2 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) inkubiert (2-fach umkristallisiert aus Methanol/2 N HCl; Verunreinigungen an aktivierte Holzkohle absorbiert; KÖST, H.P., unveröffentlicht). Kontrollansätze enthielten zusätzlich 10 bzw. 50 mmol/l Aminotriazol. Nach Zugabe von H_2O_2 (Endkonzentration 0.03%) verfärbten sich die Zellen in wenigen Sekunden dunkelbraun, was auf eine sehr hohe Katalase-Aktivität schließen läßt. Auch die Kontrollansätze verdunkelten sich nach wenigen Minuten. Dies bedeutet, daß die Berberis-Katalase(n) gegenüber dem Standardinhibitor Aminotriazol relativ unempfindlich sind. Die Zellen wurden nach 90 Min. in Fixierungspuffer gewaschen und wie beschrieben gefärbt, kontrastiert und eingebettet. Die mikroskopische Analyse der Osmiumschwarz-Verteilung zeigte, daß das DAB-Präzipitat nicht nur in den Microbodies, sondern überwiegend im Cytoplasma zu finden war, was lichtmikroskopisch zu einer einheitlichen Dunkelfärbung des Cytoplasmas führte (Abbildung 40). Die ungewöhnliche Unempfindlichkeit der Berberis-Katalase(n) gegenüber Aminotriazol sowie die zum Teil wohl cytoplasmatische Lokalisation der Katalase erklären die Schwierigkeiten eines cytochemischen STOX-Nachweises über die $CeCl_3$ -Methode.

Die Ausnutzung einer cytoplasmatischen Katalase hingegen ließ es möglich erscheinen, die cytochemische STOX-Identifizierung in einer Art gekoppeltem optischen Test durchzuführen. STOX sollte Substrat-spezifisch Wasserstoffperoxid bilden, welches in einer Hilfsreaktion mit endogener cytoplasmatischer Katalase und exogen zugesetztem DAB zur



ZELLVOLUMEN (%)	
VAKUOLE	90
CYTOPLASMA	10
Kern	10
Proplastiden	7
Mitochondrien	4
r - ER	1,5
Dictyosomen	1

Abbildung 39 Schematisches Bild einer Suspensionskulturzelle von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* bei lichtmikroskopischer Beobachtung. Der Anteil der verschiedenen Zellkompartimente wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen planimetrisch ermittelt.
Zellkern (N), Cytoplasma (CP) und Zellwand (CW).

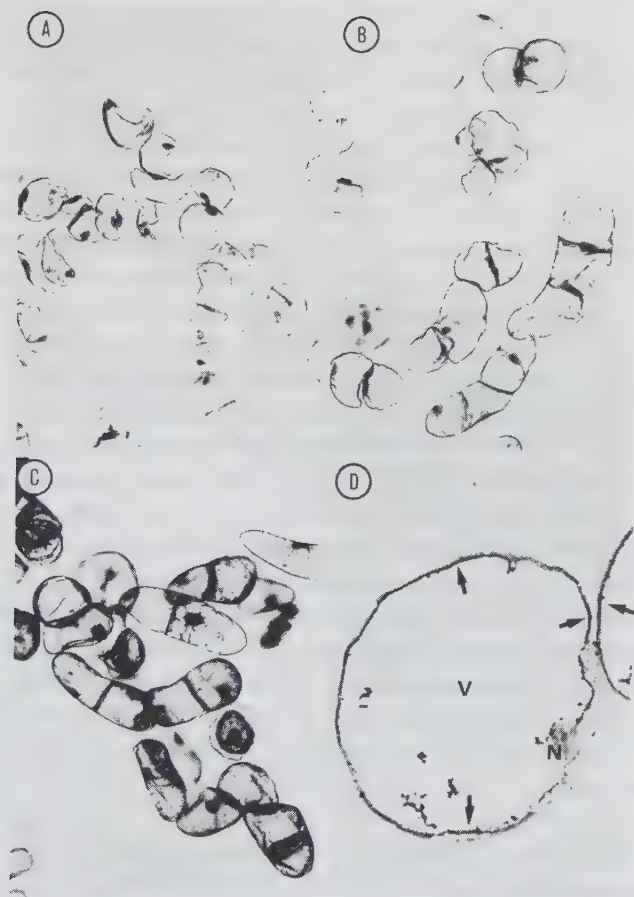
Abbildung 40

Lichtmikroskopische Darstellung des cytochemischen STOX-Nachweises in *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*. Nachgewiesen wird das enzymatisch gebildete H_2O_2 , welches von einer endogenen Katalase in Gegenwart von DAB zu einem osmiophilen Präzipitat reagiert.

- (A) Unbehandelte Kontrollzellen, das Cytoplasma erscheint völlig kontrastarm.
- (B) Cytochemisches Kontrollexperiment mit (R)-Retikulin. Keine Ausbildung kontrastreicher Strukturen im Cytoplasma. Das (R)-Enantiomer wird von STOX nicht oxidiert. Mit dem STOX-Inhibitor Acetylaceton ergab sich das gleiche Bild.
- (C) Cytochemischer STOX-Nachweis mit (S)-Retikulin führt zu einer deutlichen Verdunkelung des Cytoplasmas.
- (D) Dünnschnittpräparat (ca. 1 µm) von (C). Pfeile zeigen die stark osmiophilen Reaktionsprodukte am Tonoplasten. Zellkern (N).

Experimentelle Bedingungen und mikroskopische Präparation sind im Text beschrieben.

Abbildung 40



Osmiumschwarz-Bildung führt. Die 3 h mit 2% Glutardialdehyd - wie beschrieben - fixierten Zellen wurden gründlich gewaschen, abzentrifugiert und in Substrat-/DAB-Lösung aufgenommen (0.09 mmol/l (S)-Retikulin; 1.8 mg/ml DAB; in 75 mmol/l Tris-Puffer, 2 mmol/l MgCl_2 pH 8.0). Kontrollen enthielten entsprechende Konzentrationen an (R)-Retikulin oder waren mit 80 mmol/l Acetylacetone als STOX-Inhibitor 15 Min. vorinkubiert worden. Nach 19 h waren die Ansätze mit (S)-Retikulin schwarz gefärbt, während die beiden Kontrollen noch immer gelblich hellbraun waren. Die Zellen wurden wie beschrieben gewaschen, gefärbt, kontrastiert und eingebettet. Unter Beachtung gleicher Schnittdicken zeigte sich das in Abbildung 40 dargestellte Bild. Noch einmal konnte damit die absolute Stereospezifität der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase gezeigt werden, welche das (R)-Enantiomer unberührt läßt (vgl. Abb. 40). STOX läßt sich cytochemisch im Cytoplasma lokalisieren. Ob es dort löslich oder doch kompartimentiert vorliegt, läßt sich lichtmikroskopisch nicht zeigen. Auch die Elektronenmikroskopie konnte dies in diesem Versuch nicht entscheiden, da man zum einen mit den dafür nötigen Schnittdicken (50 - 100 nm) kein genügend kontrastreiches Bild erzielen konnte, man zum anderen Strukturen in der Größenordnung der Schnittdicke des Präparats nicht mehr genügend auflösen kann. Zur Beantwortung der Frage nach der Form, in welcher das im Cytoplasma cytochemisch nachgewiesene STOX vorliegt, mußten andere Wege beschritten werden.

4.3.2 Isolation einer subzellulären Vesikel-Fraktion mit STOX-Aktivität

Die Entdeckung der Analysemöglichkeiten, welche die Auftrennung von zellulären Organellen in einem Schwerfeld entsprechend ihrer Dichte oder Strömungswiderstands bieten, führte zur Entwicklung zahlreicher Zentrifugations-Techniken und Trennmedien (Kieselgele, iodierter organische Verbindungen; vgl. PRICE, 1982; LIN et al., 1985). Mit am gebräuchlichsten sind Saccharosedichte-Gradienten, wobei bei Ver-

wendung dieser Technik mögliche osmotische Probleme zu berücksichtigen sind.

Ausschlaggebend für ein aussagekräftiges Experiment zur Gewinnung subzellulärer Strukturen ist die möglichst schonende und schnelle Präparation der aufzutrennenden Strukturen. Dazu wurden Zellsuspensionskulturen von Berberis wilsoniae var. subcaulialata zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wachstumsphase durch vorsichtiges Abfiltrieren des Mediums geerntet und nach der in Abschnitt II. 5.2 beschriebenen schonenden Prozedur aufgeschlossen. 10 ml der zur Sedimentation größerer Zellbruchstücke vorzentrifugierten (10 min., 1500 g, 4°C) Organellen- und Vesikel-haltigen Präparation wurden über einen kontinuierlichen linearen Saccharosedichte-Gradienten geschichtet (48 ml; 18 - 60% w/w in Gradienten-Puffer, vgl. II. 5.2) und bei 100 000 g 4 h zentrifugiert (4°C SW 25.2 Rotor, Spinco, USA). Die Gradienten wurden vom Boden her mit einer Peristaltikpumpe ausgepumpt und fraktioniert (2 ml) aufgefangen. Der Saccharosegehalt der Fraktionen wurde mit einem Abbé Refraktometer (Zeiss, Oberkochen) bestimmt, Enzym-Aktivitäten nach den in Abschnitt II.6 angegebenen Verfahren. Von Interesse war dabei natürlich die Verteilung von Aktivitäten der Enzyme, welche an der Berberin-Biosynthese beteiligt sind (eine Zusammenfassung geben ZENK et al., 1985). Die Norlaunosolinsynthese wie alle an der Berberin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen waren bereits im Überstand des Dichtegradienten lokalisiert worden. In einer partikulären Fraktion höherer Dichte ($\rho = 1.14 \text{ g/cm}^3$) konnte das Berberinbrücken-Enzym (BBE, STEFFENS, 1985) und die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase lokalisiert werden. Auch nach 12 h Zentrifugation bei 100 000 g konzentrierte sich die STOX-Aktivität auf diesen Dichtebereich, was bedeutet, daß 1.14 g/cm^3 die tatsächliche Schwebedichte der Partikel ist. Wurde die gleiche Präparation mit tiefgefrorenem Gewebe durchgeführt, fanden sich das Berberinbrücken-Enzym wie auch STOX im Überstand des Dichtegradienten. Zu dem gleichen Ergebnis gelangte man, wenn man die im Dichte-

gradienten aufgetrennte partikuläre STOX-Aktivitätszone nach Einfrieren und Wiederauftauen erneut auf einem Dichtegradienten auftrennen wollte. Die unterschiedliche Lokalisation von STOX nach Einfrieren und Auftauen spricht für die Freisetzung eines zuvor vesikulär kompartimentierten Enzyms durch Aufreissen eines geschlossenen Membranraums.

Die Einordnung einer noch unbekannten vesikulären Zellkomponente in die Reihe der gut charakterisierten Zellorganelle erfolgt sinnvollerweise parallel auf zwei Ebenen, der morphologischen (nachfolgendes Kapitel III. 4.3.3) und der biochemischen. Die zentrale Rolle bei der biochemischen Klassifikation spielt das von DE⁺DUVE formulierte Marker-Konzept, welches von BOWLES et al. (1979) und HALL und MOORE (1983) auf dem aktuellen Stand der Pflanzenzellorganellenforschung zusammengefaßt wurde. Jedem der sich in ihrem charakteristischen Dichtebereich ansammelnden Zellorganelle (isopyknische Zentrifugation) lassen sich demnach charakteristische Enzym-Aktivitäten zuordnen. Abbildung 41 zeigt die Verteilung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase, des Berberinbrücken-Enzyms sowie einiger Leitenzyme pflanzlicher Organelle. Die schmale mitochondriale Fumarase-Aktivität koinzidiert völlig mit einer deutlich lichtstreuenden Zone, welche unmittelbar der STOX-Aktivität benachbart ist. Das Elektronentransport-Enzym NADH-abhängige Cytochrom C Reduktase wurde in dem für glattes endoplasmatisches Retikulum (ER) charakteristischen Dichtebereich ($1.11 - 1.12 \text{ g/cm}^3$ wie auch bei höheren Dichten (bis 1.20 g/cm^3) gefunden. Dies überrascht nicht, da die Reduktase auch in der inneren Mitochondrien-Membran ($\rho = 1.16 - 1.22 \text{ g/cm}^3$) und Ribosomen-besetztem rauhen ER vorkommt. Die Katalase-Aktivität, welche als glyoxisomaler ($1.15 - 1.18 \text{ g/cm}^3$) oder peroxisomaler Microbody-Marker gilt, zeigte ihr Aktivitätsmaximum bei einer Saccharosedichte von 1.22 g/cm^3 mit einem langen "Tailing" in den Bereich niederer Dichte. Vereinzelt wurde Katalase auch im Überstand gemessen. Eine solche nicht Microbody-assoziierte Katalase paßt recht gut zu den im vorhergehenden

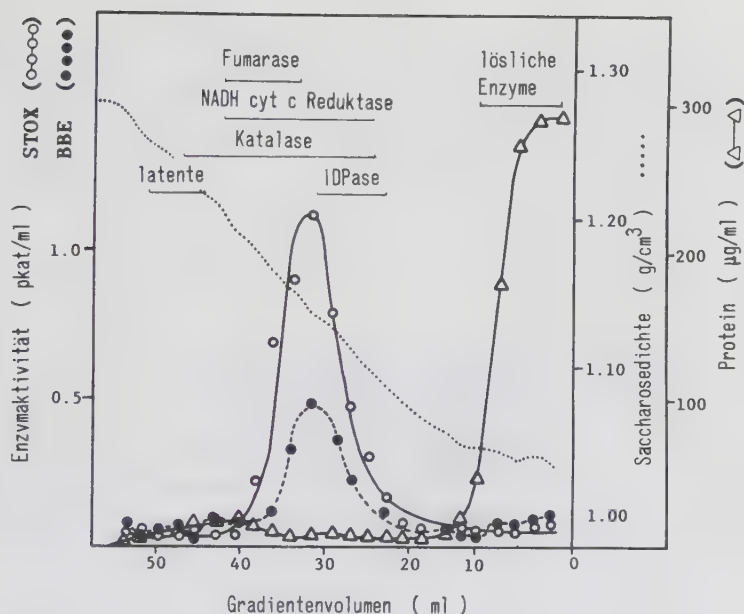


Abbildung 41

Auftrennung von 10 ml eines schonend präparierten Zellrohextrakts von *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata* über einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (18 - 60% w/w). Der Saccharosegehalt wurde refraktometrisch bestimmt. Die Messung der STOX-Aktivität erfolgte im Standardtest (vgl. III. 1.1 und 1.4), die Messung von BBE und der angegebenen Markerenzyme subzellulärer Kompartimente nach den in Abschnitt II. 6 beschriebenen Verfahren. STOX und BBE lassen sich übereinstimmend im Dichtebereich von 1.14 g/cm³ lokalisieren.

Kapitel beschriebenen Beobachtungen. Die Aktivitätssteigerung des Enzyms nach 2 - 3tägiger Inkubation bei 4°C war für die latente Inosindiphosphatase namensgebend. Ihre enge Assoziation mit Golgi-Zisternen machen sie zu einem verlässlichen Marker-Enzym. Das Auftreten eines zweiten Aktivitätsgipfels dieser Enzym-Aktivität bei höherer Dichte ist nicht ungewöhnlich. So wurde eine zweigipflige Aktivität auch in *Phaseolus aureus* und *Pisum sativum* gefunden

(BOWLES und KAUSS, 1976; RAY et al., 1969). Die Aktivitätsverteilung der Marker-Enzyme stimmt in keinem Fall 100%ig mit der Lage der STOX-Aktivität zusammen, wenngleich die ER- und Golgi-Marker diesen Dichtebereich abdecken. Da zudem im Bereich 1.14 g/cm^3 alle Sorten nicht näher definierter Plasma-Membran-Fractionen in einem Saccharose-Dichtegradienten lokalisiert sind, läßt sich das Alkaloid-synthetisierende Vesikel keinem bekannten Zellorganell eindeutig zuordnen.

Die präzise Übereinstimmung der Verteilung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase und des BBE wurden in allen Versuchen gefunden. Die enge Nachbarschaft beider Enzyme ermöglichte es, diese Vesikel hochspezifisch sichtbar zu machen. Dazu wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (4 h, 6°C , $100\,000 \text{ g}$) - wie eingangs beschrieben - durchgeführt. Ein linearer Gradient (18 - 60% w/w) enthielt allerdings zusätzlich 0.03 mmol/l (S)-Retikulin, ein paralleler Gradient die gleiche Menge des (R)-Enantiomeren, ein dritter die selbe Menge (S)-Norretikulin. Nach 16stündiger Inkubation der Gradienten bei Raumtemperatur zeigte sich folgendes Bild: Der Norretikulin-haltige Gradient wies eine deutlich gelbe Bande oberhalb der Fumarase-positiven, opaleszierenden Bande auf. Die beiden Retikulin-Gradienten zeigt Abbildung 42. Während der Gradient mit dem (R)-Enantiomeren unverändert ist, zeigt sich in dem mit (S)-Retikulin dotierten Gradienten eine blutrote Zone, deren Dichte zu 1.14 g/cm^3 bestimmbar war. Die Farbe weist klar auf das konzertierte Arbeiten des Berberinbrücken-Enzyms und der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase hin. (S)-Retikulin wurde demnach per BBE zum farblosen Scoulerin verbrückt, welches nachfolgend von STOX zum rot gefärbten Dehydroscoulerin oxidiert wurde. Dieses Experiment verdeutlichte darüber hinaus zum wiederholten Male die absolute Stereospezifität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase.

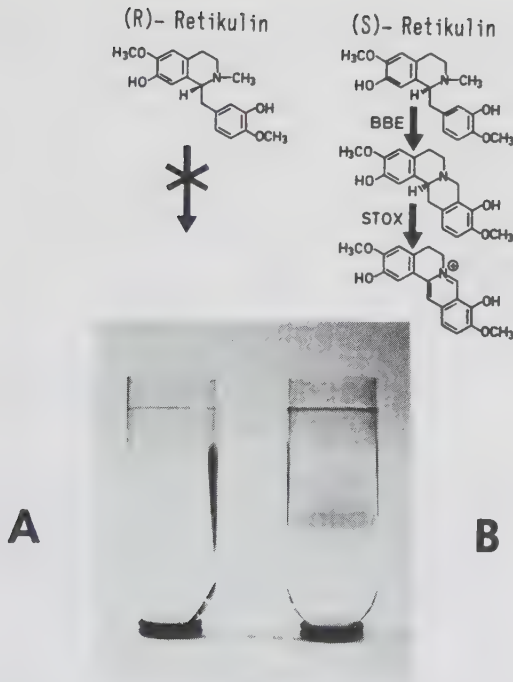


Abbildung 42 Bild zweier linearer Saccharose-Dichtegradienten (18-60% w/w) 16 h nach Auftrennung von 5 ml einer Präparation schonend aufgeschlossener Berberis-Zellen. Gradient A enthält 0.03 mmol/l (S)-Retikulin, Gradient B das entsprechende (R)-Enantiomer. Nur das (S)-Retikulin wird von einer vesikulären Fraktion ($\rho = 1.14 \text{ g/cm}^3$) über Scoulerin zum rot gefärbten Dehydroscoulerin umgesetzt.

Das Auftreten des STOX-haltigen Vesikels ist an keine Entwicklungsphase des Zellkulturwachstums gebunden. Die Vesikel lassen sich zu jedem Zeitpunkt des 14tägigen Kultivierungszyklus isolieren. Wie Abbildung 43 zeigt, nimmt ihre mittlere Schwebedichte nur unwesentlich zu, wenn man die Dichte der Fraktion mit höchster STOX-Aktivität gegen die Wachstumsdauer aufträgt.

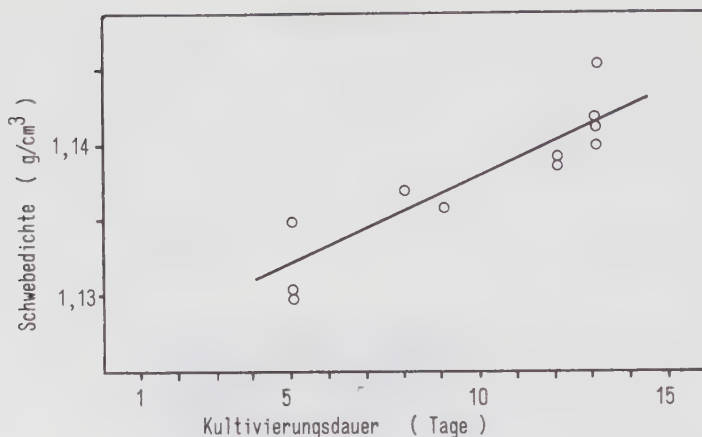


Abbildung 43 Veränderung der mittleren Schwebedichte der auf Saccharose-Dichtegradienten isolierbaren Vesikelfraktion mit (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität. Die Saccharosedichte wurde refraktometrisch bestimmt.

Interessant war die Frage, ob die Vesikel denn eine mögliche Spezialität von Berberis-Zellkulturen sind, oder ob sie auch in anderen Pflanzenfamilien nachweisbar sind, und schließlich, ob auch in differenzierten Pflanzen ein Teil der Berberin-Biosynthese kompartimentiert vorliegt.

In der beschriebenen schonenden Weise wurden verschiedene Zellsuspensionskulturen wie auch Blätter von Annona reticulata und Papaver caucasicum aufgeschlossen und über Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Analysiert wurden die fraktionierten Gradienten in den Standardtests zur Bestimmung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wie auch des BBE. Abbildung 44 zeigt die Aktivitätsprofile einiger Pflanzenzellpräparationen. Eine Kompartimentierung der beiden Enzyme konnte eindeutig nachgewiesen werden für Zellsuspensionskulturen aus der Familie der Berberidaceae (Berberis wilsoniae var. subcaulialata, B. beaniana, B. aggregata, B. stolonifera), der Ranunculaceae (Thalictrum diptero-

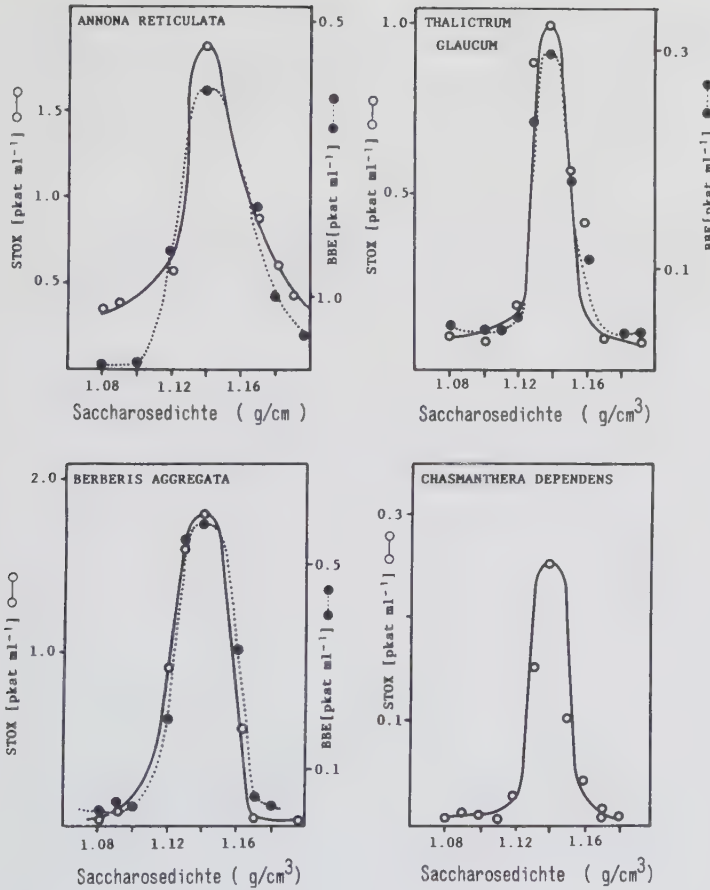


Abbildung 44

Typische Aktivitätsprofile von Vesikelpräparationen, welche durch Ultrazentrifugation in linearen Saccharose-Dichtegradienten (18 - 60%) aufgetrennt worden waren. Die Organellenpräparation wurde aus Zellkulturen wie auch aus differenziertem Gewebe von Pflanzen aus 4 verschiedenen Familien gewonnen. Annona reticulata (Annonaceae, Blätter), Thalictrum glaucum (Ranunculaceae, Zellkultur), Berberis aggregata (Berberidaceae, Zellkultur), Chasmanthera dependens (Menispermaceae, Zellkultur).

carpum, T. glaucum), der Menispermaceae (Chasmanthera dependens) sowie für Blätter von Annona reticulata (Annonaceae) und Papaver caucasicum (Papaveraceae). In allen Fällen lag die Enzym-Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase 2 - 3 mal höher als die Aktivität des Berberinbrücken-Enzyms.

Da die biochemische Einordnung der STOX-haltigen Vesikel über die Marker-Enzyme nicht zufriedenstellend erreicht werden konnte, sollten morphologische Kriterien herangezogen werden, um entscheiden zu können, ob es sich bei diesem Vesikel um eine bekannte oder um eine noch nicht beschriebene Zellstruktur handelt. Dazu wurden die STOX-Vesikelfraktionen des Saccharose-Dichtegradienten durch Zugabe von Gradientenpuffer auf einen Saccharosegehalt von 15% verdünnt und bei 4°C mit 100 000 g 4 h lang abzentrifugiert. Ein aliquoter Teil des in 200 µl Kaliumphosphat-Puffer (10 mmol/l, pH 8.4) aufgenommenen Pellets wurde auf Kollodium-befilmte Kupfergrids pipettiert und mit 0.1% Phosphorwolframsäure nachkontrastiert. Elektronenmikroskopisch ließen sich neben kleinen Partikeln viele Golgi- und ER-Vesikel erkennen (0.1 - 0.25 µm Durchmesser), desweiteren auch tubuläre Elemente und coated vesicles. Eine klare Zuordnung einer dieser Strukturen zu den STOX-haltigen Vesikeln war bei dieser heterogenen Mischung natürlich nicht möglich. Da die Dichtegradienten-Zentrifugation aber keine höhere Auflösung versprach, wurden andere Wege gesucht, die vesikulären Elemente einer Zelle aufzutrennen.

Die erst seit wenigen Jahren verfügbaren Gelfiltrationsmedien erweitern den fraktionierbaren Molekulargewichtsbereich bis auf 10^5 kD. Dies bedeutet, daß im Falle der von Pharmacia entwickelten Bisacrylamid-vernetzten Allyldextrane, wie Sephacryl S - 1000, vesikuläre Strukturen mit 300 - 400 nm Durchmesser im Ausschlußvolumen der Säule eluiert werden, kleinere Partikel entsprechend später im Eluat erscheinen. Zur Überprüfung der Möglichkeit einer Gel-chromatographischen Vesikelpräparation wurde

zunächst eine konzentrierte Suspension der interessierenden STOX-enhaltenden Vesikel hergestellt. Da aus Dichtegradienten-Experimenten eindeutig hervorging, daß keine der großen Zellorganelle, wie Zellkern, Proplastiden oder Mitochondrien das gesuchte vesikuläre STOX-Kompartiment stellt (Marker-Enzymtest; keine Veränderung der STOX-Bande im Gradienten bei Vorzentrifugation der Proben mit 10 000 g für 10 Min.) wurden diese ohnehin nicht in Frage kommenden Organelle durch differentielle Vorzentrifugation (10 000 g, 30 Min.) quantitativ pelletiert und der konzentrierte Überstand anschließend über Gelfiltration aufgetrennt.

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: 56 g abfiltrierte Zellmasse einer 13 Tage alten Zellsuspensionskultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata wurde - wie beschrieben (vgl. II. 5.2) - im Mörser schonend aufgeschlossen und das Filtrat von den leicht sedimentierbaren Organellen durch Vorzentrifugation (30 Min., 10 000 g) befreit. Der Überstand (66 ml) wurde auf zwei Zentrifugenbecher (Ultra-Clear, 32 x 89 mm, Beckman, USA) verteilt und mit je 6 ml 40% w/w Saccharoselösung unterschichtet. Nach 1.5 h Ultrazentrifugation (100 000 g, SW 25.2 Rotor) war eine deutlich trübe Zone an der Saccharosestufe erkennbar. Die Zone wurde herauspipettiert (9.2 ml 31% Saccharose) und die Enzymaktivität bestimmt (STOX: 3.4 pkat/ml; 12 pkat/mg Protein). Die Probe wurde auf eine mit Elutionspuffer (50 mmol/l Tricin/NaOH pH 7.5, 1 mmol/l Na₂EDTA, 12% w/w Saccharose) äquilibrierte Sephacryl S 1000-Säule (4.15 cm² x 71 cm) aufgegeben, mit einer Flußrate von 0.5 ml/Min. eluiert und fraktionsweise (150 Tropfen) aufgefangen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in den ³H-Ausbauteils für STOX und das BBE ergaben eine übereinstimmende Aktivitätsverteilung mit einer schwachen Aktivität in Fraktion 3 und der Hauptaktivität in Fraktion 15. Das Verhältnis dieser beiden Aktivitäten war bei verschiedenen Präparationen unterschiedlich. Eine Auftrennung der STOX-haltigen Vesikel über Gelfiltration war demnach möglich.

Als drittes Kriterium neben der Schwebedichte und der Größe sollte zur Trennung membranöser Zellstrukturen die elektrische Ladung der Vesikel bzw. deren isoelektrischer Punkt ausgenutzt werden. Die Präparation erfolgte mit einer über differentielle Vorzentrifugation vorgereinigten und per Ultrazentrifugation über einem Saccharosekissen konzentrierten Probe, deren Präparation genau in der für die Gelfiltration beschriebenen Weise erfolgte. Durchgeführt wurde die trägerfreie Fokussierung wie in Abschnitt II. 15.1 beschrieben. Nach 23 h hatte sich zwischen pH 9.2 und 10 eine deutliche Doppelbande ausgebildet. Die Säule wurde fraktionsweise (5.5 ml) abgepumpt und auf STOX-Aktivität, Saccharosegehalt und pH-Wert hin analysiert. Abbildung 45 zeigt das erhaltene Elutionsprofil. Neben einer bei pH 9.5 fokussie-

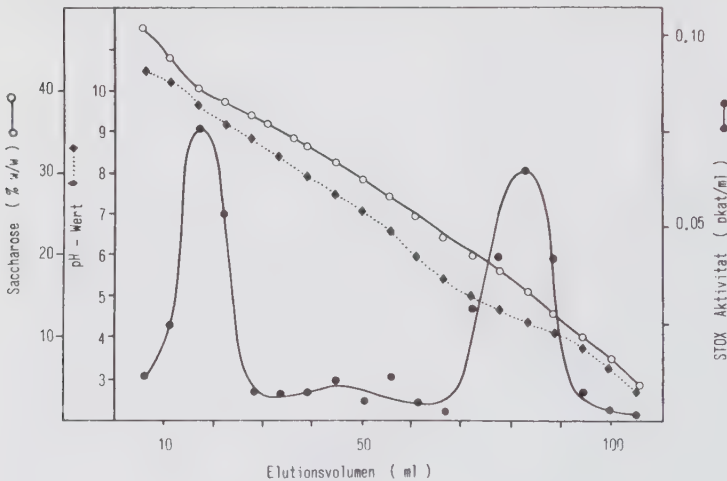


Abbildung 45 Trägerfreie isoelektrische Fokussierung einer STOX-haltigen Vesikelpräparation. Der pH-Gradient entspricht exakt dem Verlauf des stabilisierenden Saccharose-Gradienten. Die Enzymaktivität wurde im Standardtest ermittelt. Die Fokussierungsbedingungen sind in Abschnitt II. 15.1 beschrieben.

renden STOX-Aktivität, welche mit der beobachteten Doppelbande zusammenfällt, wurde eine weitere STOX-Aktivität bei etwa pH 5.5 identifiziert. Da für das isolierte Enzym ein pI von 5.7 gemessen worden war, könnte diese Aktivität als freigesetzte (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase interpretiert werden, welche durch Desintegration der Vesikel erklärbar wäre.

Mit diesem Verfahren standen nun drei völlig unterschiedliche Techniken zur Verfügung, nach denen sich die subzellulären STOX-haltigen Vesikel auftrennen ließen. Damit sollte es möglich sein, durch Kombination der unterschiedlichen Trenn-Methoden zu einer so reinen Vesikelfraktion zu gelangen, welche die eindeutige morphologische Beschreibung des STOX-haltigen Vesikels durch Elektronenmikroskopie erlaubt.

4.3.3 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Vesikel

Die bestmögliche Konservierung der Zellstruktur wird in der Regel durch Fixierung der Zellen, z.B. mit Glutardialdehyd erreicht. Eine biochemische Charakterisierung der einzelnen Zellkompartimente über ihre Marker-Enzyme allerdings kann dann in der Regel nicht mehr erfolgen, da viele Enzyme durch die Fixierung inaktiviert werden. Die bereits in III. 4.3.1 vorgestellte Unempfindlichkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase gegenüber niedrigen Glutardialdehyd-Konzentrationen hingegen erlaubte es, die zur Strukturerhaltung der Vesikel günstige Fixierung durchzuführen und gleichzeitig STOX als spezifisches Leitenzym zu messen. Zur Reindarstellung der STOX-haltigen Vesikel wurden 12 Tage alte Suspensionszellen von Berberis wilsoniae var. subcaulialata (140 g Frischgewicht) wie beschrieben (II. 5.2) aufgeschlossen und das Filtrat 30 Min. bei 12 000 g abzentrifugiert. Der Überstand (142 ml) wurde durch Zugabe von Glutardialdehyd (568 µl einer 25%igen Lösung) auf eine Endkonzentration von 0.1% eingestellt. Die Präparation wurde auf drei Zentrifugenbecher verteilt (47.3 ml), welche

jeweils einen 10 ml Stufengradienten enthielten (5 ml 50% / 5 ml 45% w/w Saccharose). Nach 1stündiger Ultrazentrifugation (100 000 g, 5°C, SW 25.2 Rotor) war an der Trennfläche 45% Saccharose/Probe eine feine milchige Zone erkennbar. Die Überstände dieser Schicht wurden abpipettiert (125 ml) und die Vesikelzone mit jeweils 27 ml 38.2% w/w Saccharoselösung (in Aufschlußpuffer) sorgsam unterschichtet. Da die Schwebedichte der STOX-haltigen Vesikel zu 1.14 g/cm^3 bestimmt worden war, mußte diese Vesikelspezies in dem nunmehr dichteren Umgebungsmedium flotierbar sein. Nach 4stündiger Ultrazentrifugation (100 000 g, 5°C) waren zwei opake Zonen im Gradienten sichtbar, eine im Bereich 42% w/w Saccharose, die andere - welche auch die Haupt-STOX-Aktivität enthielt - direkt unter der Flüssigkeitsoberfläche. Die Gradienten wurden vom Boden her fraktionsweise ausgepumpt und die flotierten enzymatisch aktiven Fraktionen vereinigt (8.5 ml, 34.5% w/w Saccharose). Eine erste Video-Interferenz-mikroskopische Darstellung (vgl. II. 8) dieser Fraktion zeigte bereits das Vorliegen sehr einheitlicher vesikulärer Strukturen im Größenbereich bis $1 \mu\text{m}$ Durchmesser (Abbildung 46). Zur weiteren Vesikelreinigung wurde diese vorgereinigte Fraktion unter den in 4.3.2 beschriebenen Bedingungen über Gelfiltration aufgetrennt und die Fraktionen (9.7 ml) auf Enzym-Aktivität hin getestet. Abbildung 47 zeigt das Elutionsprofil. Die STOX-haltigen Vesikel erscheinen eng begrenzt in nur zwei Fraktionen. Die zwei Fraktionen wurden vereinigt und durch Zugabe frischen Glutardialdehyds auf eine Endkonzentration von 2.5% eingestellt. Nach 1 h bei 20°C konnten die Vesikel pelletiert werden (3 h, 12 000 g) und wurden durch wiederholtes Resuspendieren/Abzentrifugieren (5 x 1 ml 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer pH 7.6 - Eppendorffzentrifuge) gewaschen. Das gelbe Pellet wurde in 0.5 ml Waschpuffer resuspendiert und durch Zugabe des gleichen Volumens 2% OsO_4 nachfixiert. Nach 2.5 h bei Raumtemperatur hatten sich die Vesikel dunkelbraun verfärbt. Der stark osmiophile Charakter ist keineswegs typisch für mikrosomale Präparationen aus Pflanzen.



Abbildung 46

AVEC-DIC-Videomikroskopie (vgl. II. 8) einer Vesikelpräparation, welche nach differentieller Vorzentrifugation in zwei Ultrazentrifugationschritten gereinigt worden war (Präparation s. Text). Die größten Strukturen erreichen gerade 1 μm Durchmesser. Die Aufnahme entstand mit einem Ronchi Linienfilter von einem 22.5 cm Bildschirm.

Nach Waschen des Pellets zur Entfernung überschüssigen OsO_4 wurde das Präparat - wie beschrieben - mit Aceton entwässert und in Kunstharz eingebettet. Nach Schneiden und Nachkontrastieren (III. 4.3.1) konnte die Vesikelpräparation elektronenmikroskopisch ausgewertet werden. Die über Schwebedichte und Größe aufgetrennte Präparation zeigte ein sehr einheitliches Bild (Abbildung 48 a, b). Glatte Vesikel (0.1 - 1 μm Durchmesser), welche zum Teil traubig aggregiert mit oft dunklen Präzipitaten vorlagen sowie vereinzelt typische Fragmente dictyosomaler Zisternen. Der Versuch einer weiteren Aufreinigung der Vesikel über eine trägerfreie isoelektrische Fokussierung konnte den Homogenitätsgrad der Präparation nicht mehr signifikant steigern.

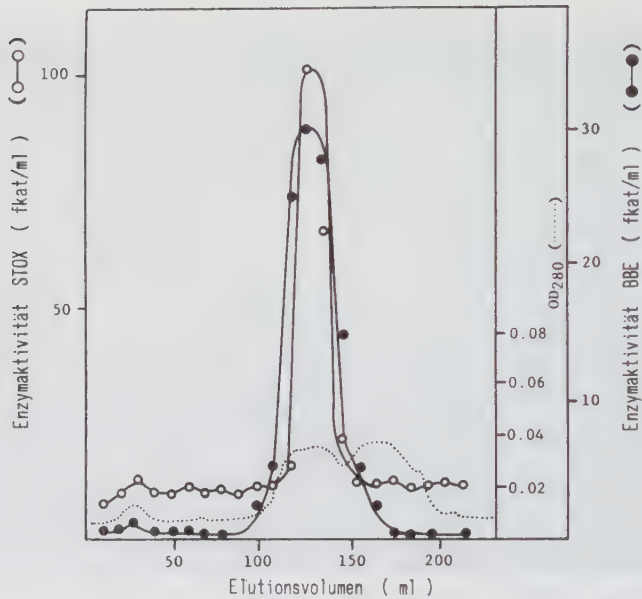


Abbildung 47 Gelfiltrationsprofil (Sephacel S-1000) einer Vesikelpräparation, welche über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation vorgereinigt worden war. STOX und BBE wurden im Standardtest gemessen (III. 1.4 und II. 6.1). Die beiden Enzyme lassen sich übereinstimmend im gleichen Elutionsbereich lokalisieren.

Die Suche nach vesikulären Strukturen im Cytoplasma von Berberis-Zellen (Abbildung 38) führt zu 3 Sorten von Vesikeln: Coated Vesicles, Vesikel des rauhen endoplasmatischen Retikulums, welche zahlreich mit dem Plasmalemma zu verschmelzen scheinen (Sternchen in Bild B) und glatte Vesikel. Letztere liegen häufig als traubige Aggregate - oft innerhalb kleiner Vakuolen - vor.

Coated Vesicles wurden in der Vesikel-Präparation nicht gefunden, ebenso wenig rER-Vesikel. Die glatten Vesikel, welche möglicherweise dictyosomalen Ursprungs sind, scheinen also die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zu beherbergen. Das traubige Zusammenlagern dieser Vesikel, welches sowohl

in der isolierten Vesikel-Präparation wie auch in der Zelle selbst beobachtet wird (offener Pfeil in Abbildung 38 und 48), könnte ein funktionelles Charakteristikum dieser Strukturen sein. Der dunkle Inhalt der Vesikel wie auch die osmiophilen Präzipitate an der Innenseite des Tonoplasten warfen die Frage auf, ob die Osmiophilie dieser Strukturen mit dem Alkaloidgehalt der Zellen in Zusammenhang stehen könnte. NEUMANN et al. hatten bereits 1983 auf das elektronenmikroskopisch sichtbare Reaktionsprodukt von OsO_4 und Indolalkaloiden hingewiesen. In Reagenzglasversuchen erwiesen sich die reinen Protoberberine tatsächlich als recht osmiophil (Bildung eines dunklen Präzipitats bei Inkubation von OsO_4 mit einer Alkaloidlösung). Die durchkonjugierten Verbindungen reagierten dabei durchwegs schneller als die zugehörigen reduzierten Verbindungen.

Um die Funktion der Vesikel verstehen zu können, ist es nötig, über die Morphologie hinaus die Zusammensetzung des Membran-umschlossenen Kompartiments zu kennen. Enzymtests hatten gezeigt, daß mit dem Berberinbrücken-Enzym und mit STOX zwei Enzyme der Berberin-Biosynthese in den Vesikeln lokalisiert sind. Ob und wieviele Proteine darüber hinaus an der Vesikelzusammensetzung beteiligt sind, sollte durch SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden. 13 Tage alte Berberis wilsoniae-Zellen (35 g Frischgewicht) wurden dazu - wie beschrieben (II. 5.2) - aufgeschlossen und nach Vozentrifugation (30 Min., 12 000 g) über 3 lineare Dichtegradienten (20 - 45% w/w Saccharose) aufgetrennt. Die STOX-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, über Gelfiltration, wie angegeben, nachgereinigt und die vereinigten aktiven Fraktionen bei 100 000 g (2 h) pelletiert. Das gelbe Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, nach Zugabe von 200 µl Boratpuffer aufgetaut und die STOX-Aktivität bestimmt (1.67 nkat/ml; 2.27 nkat/mg Protein). Die Auftrennung dieser Vesikelpräparation auf einem denaturierenden Poly-

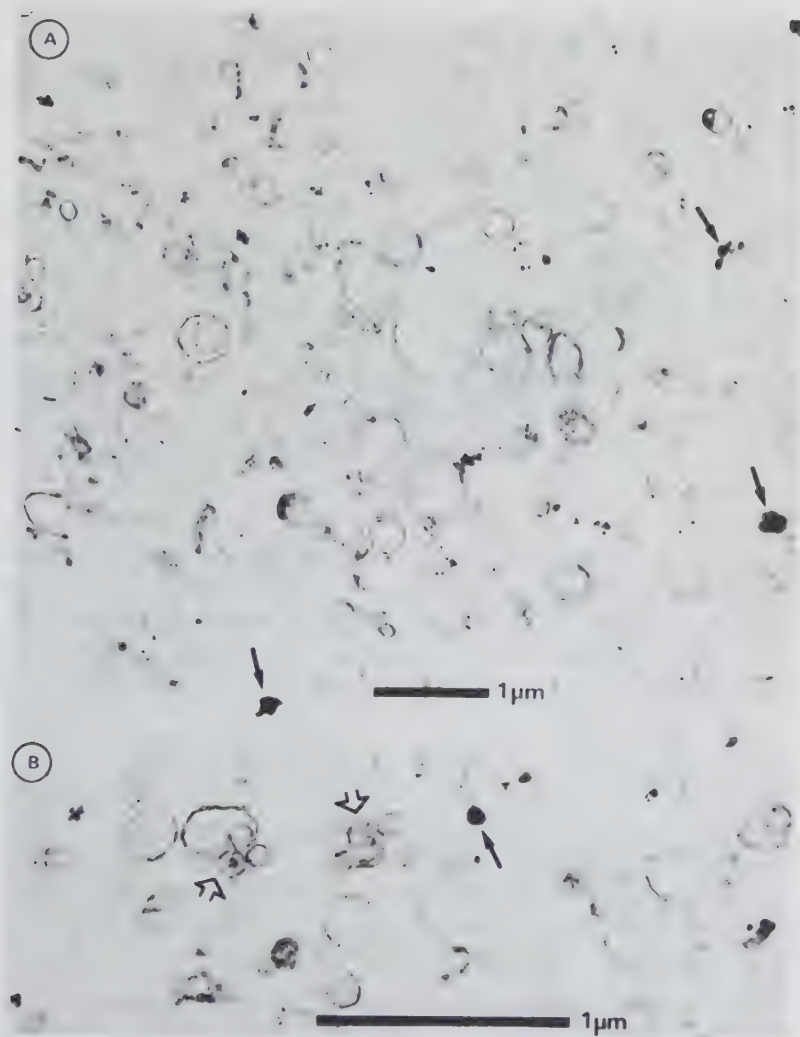
acrylamidgel (12.5% Acrylamid, vgl. II. 15.2) zeigt Abbildung 49a. Neben dem sehr eng nebeneinanderliegenden STOX und BBE lassen sich noch annähernd 20 Banden durch die Coomassie-Blue-Färbung sichtbar machen.

Die Anwesenheit von STOX in der Vesikelpräparation konnte darüber hinaus noch auf drei unterschiedliche Weisen erbracht werden. Die Auftrennung der Vesikelpräparation auf dem nativen Gel mit nachfolgender in situ-Anfärbung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität mit ihrem Substrat (vgl. III. 2.4) zeigte die für STOX typische orange fluoreszierende Doppelbande bei Betrachtung unter einer UV-Lampe (366 nm). Wurde die Vesikelpräparation immunoelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. II. 7.2) und mit dem Vesikel-freien Überstand der Saccharose-Dichtegradienten-

Abbildung 48

Elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikel, welche STOX und BBE enthalten. Die Reinigung der Vesikel erfolgte über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration an Sephacryl S-1000. Die recht einheitlichen Vesikel liegen im Größenbereich 0.1 - 1 µm, wobei die großen Vesikel an kleine Vakuolen erinnern (vgl. Abb. A). Die kleinen glatten Vesikel (offener Pfeil Bild B) scheinen in situ beobachtbaren Vesikeln (offener Pfeil in Abb. A) zu entsprechen. Die Vesikelpräparation enthält Fragmente dictyosomaler Zisternen. Die glatten Vesikel sind traubig aggregiert hauptsächlich innerhalb kleiner Vakuolen anzutreffen. Die Pfeile weisen auf osmiophile Präzipitate hin, welche in situ ebenfalls beobachtet werden konnten (Abb. B).

Abbildung 48



Ultrazentrifugation verglichen, so ergab sich unter Verwendung gereinigten Kaninchen-Anti-STOX-Serums nur mit der Vesikelpräparation ein Immunpräzipitat (Abbildung 49 b). Dies bestätigt noch einmal das ausschließlich Vesikel-gebundene Auftreten der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase. Zur Aufklärung des STOX-eigenen Coenzyms waren Fütterungsversuche mit (^{14}C)-Riboflavin unternommen worden, welche den Flavoprotein-Charakter von STOX bestätigen konnten (III. 5.2). Eine schonende Vesikelpräparation der eine Woche gewachsenen, markierten Berberis-Zellkultur zeigte nach Auftrennung über einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (18 - 60% w/w) eine signifikant erhöhte Radioaktivität im Dichtebereich von 1.14 g/cm^3 . Das in STOX eingebaute (^{14}C)-Riboflavin konnte also genau im Bereich der gefundenen Schwebedichte der untersuchten Vesikel nachgewiesen werden (Abbildung 50).

Räumlich sind drei unterschiedliche Anordnungen zwischen STOX und dem Vesikel denkbar. STOX als gelöstes Protein im Vesikel, STOX als Membran-ständiges oder transmembranöses Protein und STOX außen aufsitzend auf dem Vesikel. Da keine Membran-solubilisierenden Agenzien für die STOX-Gewinnung nötig waren, mußte nur noch zwischen der ersten und der letzten Möglichkeit unterschieden werden. Dazu wurden STOX-haltige Vesikel - wie beschrieben - präpariert und nach Vorinkubation mit Anti-STOX-Antikörpern mit einem Ferritin-markierten zweiten Antikörper, wie in II. 7.5 beschrieben, versetzt. Die elektronenmikroskopische Auswertung sollte zeigen, ob antigene STOX-Determinanten außen auf den Vesikeln nachweisbar sind. Immunelektronenmikroskopisch konnte auf diese Weise STOX jedoch nicht nachgewiesen werden. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase befindet sich also im Innern der Vesikel.

Der Nachweis der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase im Innern der Vesikel legte es nahe, daß auch die STOX-Enzymprodukte Bestandteile der Vesikel sind, zumal alle pelletierten Vesikelpräparate deutlich gelb gefärbt waren. Zur genauen Analyse wurden Vesikel aus 82 g Berberis wilsoniae-

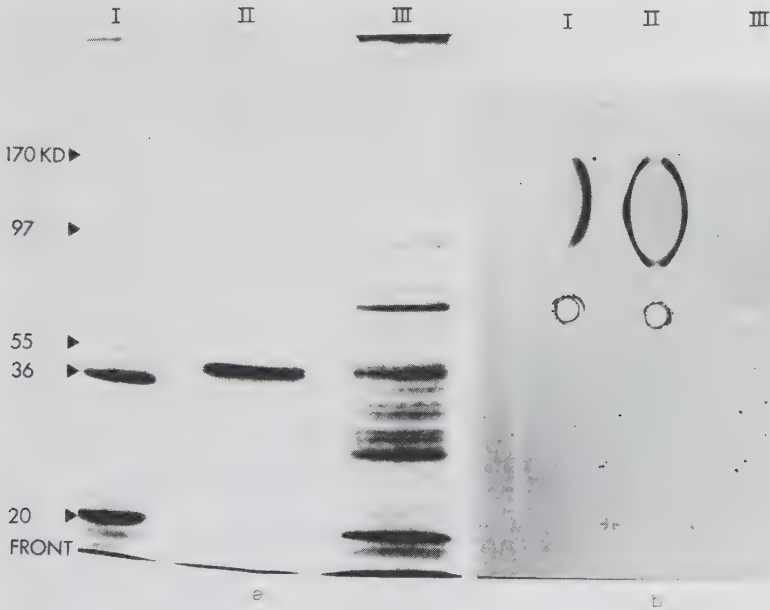


Abbildung 49

- (a) SDS-Polyacrylamidgel gereinigter Vesikel. Bahn I Markerproteine (Boehringer, Mannheim), Bahn II STOX (10 µg), Bahn III Vesikelproteine (36 µg). Die Elektrophorese wurde -wie in II. 15.2 beschrieben- durchgeführt, die Vesikel waren über Ultrazentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten und Gel-filtration an Sephacel S-1000 gereinigt worden.
- (b) Immunelektrophoretischer Vergleich STOX-haltiger Vesikel (Bahn I, 5 µg Vesikelprotein) mit der Cytosolfraction eines Saccharose-Dichtegradienten (Bahn III, 4.8 µg Protein). Als Referenz diente elektrophoretisch sauberes STOX in Bahn II. Die Elektrophorese wurde -wie in II. 7.2 beschrieben- durchgeführt. In die Längsrillen wurden je 80 µl Kaninchen-Anti-STOX-Serum (II. 7.1) einpipettiert.

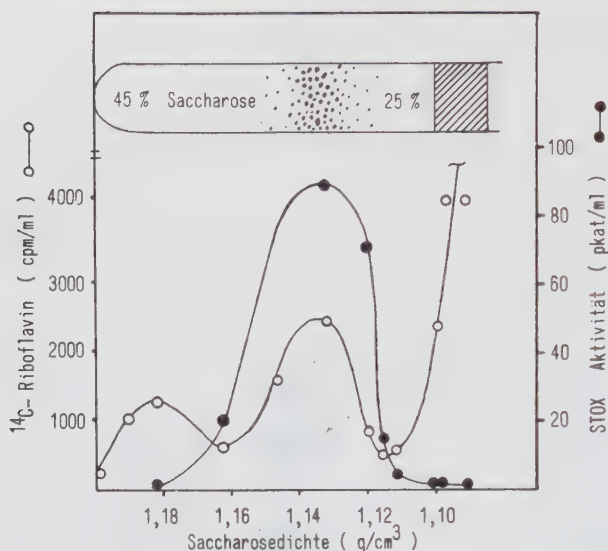


Abbildung 50

Auftrennung von 26 ml einer Vesikelpräparation einer 7 Tage alten *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*-Zellsuspensionskultur über einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (25 - 45% w/w). Die Zellen waren 4 Tage in Gegenwart von $[^{14}\text{C}]$ -Riboflavin gewachsen. Die Probe enthielt 1.36×10^6 dpm. Die erhöhte Radioaktivität im Dichtebereich der STOX-haltigen Vesikel kann durch den Einbau von $[^{14}\text{C}]$ -Riboflavin in STOX erklärt werden.

Zellen (10 Tage gewachsen) - wie oben beschrieben - präpariert und bei 100 000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit 0.3 ml Äthanol extrahiert. Dünnschichtchromatographisch konnten als Hauptprodukt Jatrorrhizin sowie Columbamin und Palmatin identifiziert werden (Laufmittel 4 und 7 bzw., nach NaBH_4 -Reduktion, 5 und 8; vgl. II. 14). Eine weitere Verbindung konnte nicht identifiziert werden; möglicherweise handelt es sich hierbei um ein glykosiliertes Protoberberin. Tetrahydroprotoberberine und Dehydroscoulerin wurden nicht gefunden. Damit entspricht die Alkaloidzusammensetzung der Vesikel genau dem für *Berberis wilsoniae* var. *subcaulialata*

beschriebenen Protoberberin-Alkaloidmuster (RÜFFER, 1984; HINZ und ZENK, 1981), was auf die wohl zentrale Rolle der Vesikel in der Protoberberin-Bildung hinweist.

Die Fluoreszenz-mikroskopische Analyse von Berberis-Zellen hatte bereits darauf hingedeutet (III. 4.3.1), daß die Protoberberine durch den Tonoplasten vom Cytoplasma getrennt sind. Eine unbehinderte Diffusion durch diese Membran scheint demnach für diese quaternären Verbindungen nicht möglich zu sein. Zur Klärung der Frage, ob die im Vesikel durch STOX gebildeten Protoberberine dieses Kompartiment verlassen können, wurden Vesikel, wie beschrieben, aus einer Berberis wilsoniae-Zellsuspensionskultur (14 Tage gewachsen, 30 g Frischgewicht) präpariert, die großen Organelle abgetrennt (30 Min. Zentrifugation bei 12 000 g) und die Vesikel im Aufschlußpuffer mit (S)-Retikulin inkubiert (30 µmol pro 20 ml Vesikelpräparation). Nach 24 h (Raumtemperatur) wurden je 20 ml dieser Lösung auf einen einstufigen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet (5 ml 48%, 5 ml 15% w/w Saccharose) und 5 h mit 100 000 g abzentrifugiert. Die von intravesikulär gebildetem Dehydroscoulerin rot gefärbte Vesikelzone (Grenzschicht 48%/15%) wurde herauspipettiert, mit Gradientenpuffer auf 12% Saccharose verdünnt und die schwach rötliche Lösung (15 ml) über einen eben beschriebenen Einstufengradienten geschichtet. Falls Protoberberine frei über die Vesikelmembran diffundieren können, sollten sich die gefärbten Moleküle gleichmäßig im intra- und extravesikulären Raum verteilen. Nach 10 h wurde der Gradient bei 100 000 g abzentrifugiert (4 h, 6°C) und die Verteilung der Rotfärbung analysiert. Die gesamte Färbung war mit den Vesikeln abzentrifugiert worden. Das als quaternäres Ammoniumkation vorliegende Dehydroscoulerin kann aus dem Vesikel also nicht herausdiffundieren. Die eindeutige Identifizierung des vesikulären roten Produkts als Dehydroscoulerin erfolgte dünnschichtchromatographisch sowie massenspektroskopisch nach Reduktion mit NaBD₄ zum d₂-Scoulerin, EI-MS m/z (rel. Int.%): 329 (M⁺ 31), 179 (100),

164 (19), 151 (70), 136 (39) oder nach NaBH_4 -Reduktion zum Scoulerin, CI-MS m/z (rel. Int.%) 328 ($\text{M} + \text{H}^+$ 100).

4.3.4 In vitro-Biotransformations-Experimente

Die aus Berberis-Zellen bzw. aus den STOX-haltigen Vesikeln isolierbaren Protoberberine sind durchwegs stärker methyliert als der Protoberberinvorläufer (S)-Retikulin oder, wie Berberin, nicht weiter methylierbar. Das Zusammenspiel vesikulärer Enzyme mit cytosolischen Enzymen sollte daher für die Organisation der Protoberberin-Biosynthese von Aufschluß sein. Das experimentelle Procedere bestand aus der Inkubation von Vesikeln mit (^{14}C -N)-Retikulin in Gegenwart von Scoulerin-9-O-Methyltransferase (von S. Mümmler zur Verfügung gestellt) und/oder Berberinsynthase (von Dr. M. Rüffer zur Verfügung gestellt). Die Analyse der Produkte erfolgte dünnschichtchromatographisch.

Wie bereits dargelegt, läßt sich nach Inkubation der Vesikel mit (S)-Retikulin das rote Dehydroscoulerin aus den Vesikeln isolieren. Das gleiche Produkt erhält man, wenn man diesen Versuch mit (S)-Scoulerin durchführt. Zwei Schlußfolgerungen lassen sich daraus ableiten. Die Vesikel nehmen das 1-Benzylisochinolin (S)-Retikulin wie auch das Tetrahydroprotoberberin (S)-Scoulerin in irgendeiner Weise auf. Da kein 1,2-Dehydroretikulin isoliert werden konnte, scheint eine strikt sequentielle enzymatische Umsetzung des (S)-Retikulins in der Folge BBE - STOX zu erfolgen. Die zusätzliche Anwesenheit von S-Adenosylmethionin führt nicht zur Bildung eines höher methylierten Produkts. Eine vesikuläre Methyltransferase, welche Scoulerin oder sein oxidiertes Pendant methylieren könnte, ist daher wenig wahrscheinlich. Das Produkt des BBE, (S)-Scoulerin, wird von einer regio- und stereospezifischen Scoulerin-9-O-Methyltransferase (MÜMMLER et al., 1985) zum Tetrahydrocolumbamin umgesetzt. Das Zusammenspiel Methyltransferase/Vesikel wurde mit verschiedenen Vesikel /Methyltransferase-Verhältnissen untersucht. In einem Gesamtvolumen von 400 μl enthielten die Ansätze 5 nmol (S)-Retikulin (7.8×10^6 dpm),

20 nmol S-Adenosylmethionin, 50 µl Tricinpuffer pH 7.4 bei folgenden Verhältnissen der Enzym-Aktivitäten (pkat) vesikuläres STOX/Methyltransferase: 28/2.8; 5.5/5.5; 2.8/28. Nach 15 h wurden die Ansätze im Alkalischen mit Essigester extrahiert und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel 4 und 7 bzw. nach NaBH₄-Reduktion 5 und 6; II. 14). Die prozentuale Verteilung der identifizierbaren radioaktiven Produkte in den drei Ansätzen ist nachstehend aufgeführt.

STOX/Methyltransferase	10/1	1/1	1/10
Retikulin (nicht umgesetzt)	60	53	31
1,2-Dehydroretikulin	0	0	0
Scoulerin	19	34	45
Dehydroscoulerin	0	0	0
Columbamin	31	13	19
Tetrahydrocolumbamin	0	0	0

In keinem der Ansätze wurde 1,2-Dehydroretikulin oder oxidiertes Scoulerin gefunden, obgleich Scoulerin gebildet wird und die Vesikel für Tetrahydroprotoberberine permeabel sind. Damit kausal zusammenhängen scheint die Anwesenheit der cytosolischen Scoulerin-spezifischen Methyltransferase. Je höher ihre Aktivität ist, desto größer ist der Anteil an isolierbaren Tetrahydroprotoberberin-Alkaloiden. Das enzymatisch gebildete Tetrahydrocolumbamin muß, da STOX ausschließlich vesikulär vorkommt, in die Vesikel aufgenommen werden, um dort zu Columbamin oxidiert zu werden.

Zur Bildung von Berberin werden die beiden A-Ring-Substituenten des Columbamins enzymatisch zu einer Methylendioxygruppe verbrückt (RÜFFER und ZENK, 1985). Wie dieses Enzym,

die Berberinsynthese, in vitro mit dem System aus Vesikeln und der cytosolischen Scoulerin-9-O-Methyltransferase zusammenarbeitet zeigt Tabelle 14. Den vesikulären Umsatz von Retikulin zu Scoulerin und Dehydroscoulerin in Gegenwart von SAM bestätigt noch einmal Ansatz (a). Die zusätzliche Methyltransferase (Ansatz b) führt - wie bereits gezeigt - zur Bildung von Columbamin, verhindert aber quantitativ die Oxidation von Scoulerin. Als zweites oxidiertes Protoberberin konnte neben Columbamin im Ansatz (c) Berberin nachgewiesen werden. Da das quaternäre Substrat der Berberin-Synthase im Vesikel vorliegt und ihn nicht verlassen kann, das Enzym aber im extravesikulären Raum angeboten wurde, muß die Berberin-Synthase in irgendeiner Weise in die Vesikel gelangt sein, ein Vorgang, welcher für viele subzelluläre Kompartimente keineswegs ungewöhnlich ist.

In vitro ist es also möglich, (S)-Retikulin durch die Kooperation cytoplasmatischer Enzyme mit Vesikeln, welche zwei Schlüsselenzyme der Protoberberin-Biosynthese enthalten, zu Berberin umzusetzen. Intermediäre Tetrahydroprotoberberine müssen dabei die Vesikel verlassen, werden von diesen aber - nach enzymatischer Modifizierung - wieder aufgenommen.

gebildetes Alkaloid	Relative Alkaloidmenge (%)		
	a	Ansatz b	c
Retikulin*	41	37	11
Dehydroretikulin	0	0	0
Scoulerin	20	8	0
Dehydroscoulerin	39	0	0
Tetrahydrocolumbamin	0	0	0
Columbamin	0	55	40
Canadin	0	0	0
Berberin	0	0	49

*nicht umgesetzter Rest

Tabelle 14

Biotransformation von radioaktiv markiertem Retikulin durch Kooperation von Vesikeln und zugesetzten Enzympräparationen in vitro.

Alle Ansätze enthielten 17 μmol Tricin/NaOH-Puffer pH 7.5, 0.34 μmol Na_2EDTA in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml bei einer Saccharose-Konzentration von 14% w/w.

Ansatz (a) enthielt zusätzlich 0.01 mmol/l (S)-[^{14}C -N]-Retikulin (7.8×10^6 dpm), 0.2 mmol/l SAM und 0.1 ml Vesikelpräparation (0.02 mg Protein mit 5 pkat BBE und 22 pkat STOX),

Ansatz (b) enthielt neben den Komponenten von Ansatz (a) noch 22.5 pkat S-Adenosyl-L-Methionin:(S)-Scoulerin-9-O-Methyltransferase,

Ansatz (c) entsprach Ansatz (b) mit dem Zusatz von 0.01 pkat Berberinsynthase.

Nach 10stündiger Inkubationszeit bei 30°C wurden die Alkaloide extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel 4 und 5 nach NaBH_4 -Reduktion; vgl.

II. 14).

5. Biotechnologische Aspekte der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase

Schon weit zurück in vorgeschichtlicher Zeit war die technologische Nutzung biologischer Prozesse eng mit der Entwicklung unserer Spezies verbunden. Tausende von Jahren hatte die alkoholische Gärung in ihren vielen Facetten die Biotechnologie dominiert, bis - beginnend im letzten Jahrhundert - eine rasante Entwicklung biologischer Verfahrenstechniken einsetzte (PRÄVE et al., 1984). Ausgenutzt werden dabei in der Regel spezifische Stoffwechselleistungen intakter Organismen aus allen Bereichen der belebten Natur, wie auch zellfreie Präparationen der gewünschten biochemischen Kapazität (z.B. Enzyme). Die bisherigen Erfolge und die riesigen Erwartungen, die man an die Biotechnologie stellt, lassen uns heute bei jedem neuentdeckten Enzym fragen, ob es nicht Reaktionen katalysieren kann, welche von den chemischen Wissenschaften nicht, schlecht, oder nur unter großem Kapitaleinsatz beherrscht werden.

Die Oxidation reduzierter Vorstufen zu den quaternären Protoberberinen durch die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ist unter diesem Gesichtspunkt uninteressant, da dieser Schritt auf einfache Weise chemisch durchgeführt werden kann (vgl. II. 4.3). Lediglich die Stereospezifität könnte für die Analytik und die weitere Biosyntheseforschung von Bedeutung sein. Wesentlich interessanter ist die enzymatische Oxidation der 1-Benzylisochinoline mit (S)-Konfiguration. Eine maximale Ausbeute von 55% konnte bei der chemischen Oxidation des B-Rings von Norretikulin zu einem vollaromatisierten Norretikulin-N-Benzylchlorid erhalten werden. Für anders substituierte 1-Benzylisochinoline waren die Ausbeuten noch wesentlich schlechter (BUCHS und BROSSI, 1981). Das Interesse an dieser Reaktion liegt in der Chiralität des C-Atoms 1. Morphin, welches sich biogenetisch vom 1-Benzylisochinolin (R)-Retikulin ableitet, zeigt in der entsprechenden Position die (R)-Konfiguration. Ausschließlich dieses natürlich konfigurierte (-)-Morphin weist die

starke schmerzlindernde Wirkung auf. Das nicht natürlich vorkommende (S)-(+)-Morphin bindet um einen Faktor $10^3 - 10^4$ mal schlechter an den physiologischen Opiatrezeptor (μ). Eine gute chemische Morphinsynthese muß daher allein auf die (R)-Konfiguration ausgerichtet sein. Da die klassischen Synthesewege aber über razemische 1-Benzylisochinolin Intermediate führen, muß es Ziel sein, das in diesem Fall unerwünschte (S)-Enantiomer in seinen optischen Antipoden quantitativ zu überführen. Die von RICE über regioselektive Grewe-Zyklisierung ausgearbeitete Totalsynthese von Morphin versucht diesen Anforderungen gerecht zu werden (zusammengefaßt von RICE, 1985, Abb. 51). Als Problem erwiesen sich allerdings die erwähnten schlechten Ausbeuten bei der Oxidation des unerwünschten (S)-Enantiomeres, welche nach Reduktion (NaBH_4) zu einem razemischen Produkt und zu der damit nach jedem Oxidations/Reduktions-Zyklus nötigen Razematspaltung führt (RICE und BROSSI, 1979; SOHAR und SCHOENE-WALDT, 1974). Beide Probleme könnten mit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase gelöst werden: das unerwünschte (S)-Enantiomer würde quantitativ oxidiert werden können, die Stereospezifität des Enzyms würde die Razematspaltung überflüssig machen, Zyklen aus enzymatischer Oxidation und chemischer Reduktion könnten quantitativ zu einem Produkt mit der gewünschten (R)-Konfiguration führen.

Neben dem präparativen Aspekt stehen die analytischen Möglichkeiten, welche die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase bietet. Die oft nur winzigen Mengen an isolierbaren 1-Benzylisochinolin und Tetrahydroprotoberberinen machen die qualitative Drehwertbestimmung oft unmöglich. Sind die Extinktionskoeffizienten zugänglich, läßt sich jedoch enzymatisch der Anteil des (S)-Enantiomers in wenigen Proben von Mikrogramm bestimmen, indem in einer photometrischen Endpunktbestimmung die Menge des oxidierten (S)-Enantiomeren gemessen wird. Weiterhin kann die spezifische Einführung eines radioaktiven Isotops in 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine mittels STOX unkompliziert erreicht werden. Das in reduzierter Form vorliegende und zu markierende Substrat wird enzy-

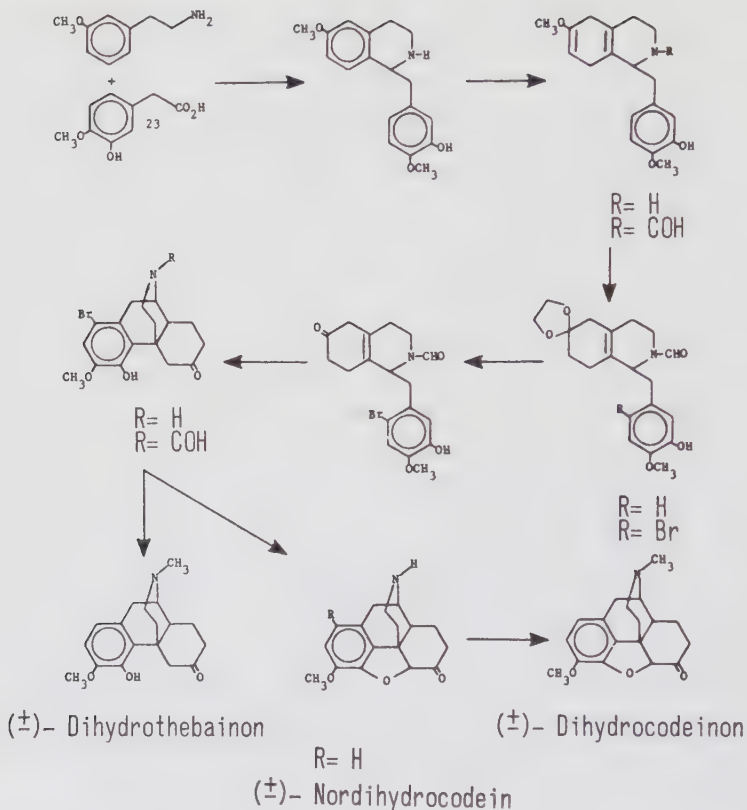


Abbildung 51 Syntheseroute zur Darstellung racemischer Morphine (NIH-Totalsynthese). Die Ausbeute an (+) Dihydrocodeinon, bezogen auf m-Methoxyphenäthylamin, beträgt 29% (Abbildung nach RICE, 1985).

matisch oxidiert, unreaktiertes Substrat chromatographisch abgetrennt. Reduktion mit NaB^3H_4 (NaB^2H_4) ergibt ein racemisch markiertes Ausgangsprodukt. Sollen markierte Substanzen mit (R)-Konfiguration rein dargestellt werden, lässt sich

das (S)-konfigurierte Produkt enzymatisch oxidieren und kann in der Regel leicht von unerwünschten (R)-Enantiomeren abgetrennt werden. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zeigt damit im analytischen wie im präparativen Bereich vielversprechende Einsatzmöglichkeiten.

5.1 Immobilisierung von STOX

Die gute Wasserlöslichkeit von Proteinen erweist sich oft hinsichtlich wiederholter Verwendbarkeit und dem kontinuierlichen präparativen Einsatz von Enzymen als ein Problem. Da Enzym und Substrat im gleichen Medium vorliegen, ist eine Abtrennung des Enzyms vom Produkt zur Wiederholung der katalytischen Umsetzung nicht möglich, was viele Prozesse kostspielig und damit wenig attraktiv macht. Schon früh wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, Enzyme in Formen zu überführen, welche eine Trennung von Biokatalysator und Substratlösungsraum ermöglicht. Neben Einschluß der gelösten makromolekularen Enzympräparation in mikroporöse Reaktionsräume (Kapseln, Fasern, Membranen) wurden auch zahlreiche Techniken zur Bindung (adsorptiv, kovalent) der Biokatalysatoren an inerte Trägerstoffe entwickelt (MESSING, 1975; HARTMEIER; 1985 a,b). Als Biokatalysatoren dienen dabei gereinigte Enzyme, katalytisch aktive Rohenzympräparationen oder sogar noch intakte Zellen, welche die gewünschte Reaktion katalysieren können.

5.1.1 Immobilisierung intakter Zellen

Mikrobielle Zellen werden schon seit langem immobilisiert und erfolgreich zur Produktion oder Umwandlung der unterschiedlichsten Substanzen verwendet (BERGER, 1982; CRUEGER und CRUEGER, 1984). Erst seit wenigen Jahren dagegen verwendet man pflanzliche Zellen für diese Techniken. Die beschriebenen Verfahren ähneln sich dahingehend, daß die Pflanzenzellen den Immobilisierungsvorgang als lebensfähige Organismen überstehen. Dabei werden sie entweder in präformierten Polymeren (Carrageen, Alginat) eingeschlossen (BRODELIUS et al., 1979; NILSSON et al., 1983) oder können in den Hohlräumen von Polyurethanflocken als dichte Aggregate wachsen (LINDSEY et al., 1983). Die Biotransformation

von β -Methyl-Digitoxin zum klinisch wichtigen β -Methyl-Digoxin durch Alginat-fixierte Digitalis lanata Zellen und die gegenüber Suspensionszellen um mehr als zwei Größenordnungen erhöhte Capsaicinproduktion von Zellen des Chilli Pfeffers (Capsicum frutescens) sind erfolgreiche Beispiele dieser beiden Strategien (ALFERMANN et al., 1982; LINDSEY und YEOMAN, 1984). Die Empfindlichkeit der Zellen bzw. deren interessierender Enzymsysteme stand jedoch der Verwendung niedermolekularer Polymerbausteine stets im Wege. Vorversuche mit Acrylamid und Berberis Zellen hatten allerdings gezeigt, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Aktivität dieser Zellen auch nach Polymerisation noch erhalten war. Da die Verwendung ganzer Zellen die aufwendige zellfreie Präparation der Enzymaktivität überflüssig macht, sollte die Immobilisierung ganzer Zellen in Polyacrylamid näher untersucht werden.

Die Präparation des Zellpolymerisats erfolgte in Anlehnung an das von PARA et al. (1985) für Mikroorganismen beschriebene Verfahren. 25 g 4-fach mit Wasser nachgewaschener Zellen (Frischgewicht) von Berberis wilsoniae var. subcaulialata (5 Tage gewachsen) wurden in 10 ml Wasser suspendiert und zu einer Lösung aus 10 ml Acrylamid (30% w/v), 4 ml Bisacrylamid (1% w/v), 5.9 ml Tris-Puffer (1.5 mol/l, pH 8.7), 0.1 ml Ammoniumperoxodisulfat (10% w/v) und 10 μ l TEMED gegeben. Das Polymerisat (22 g) wurde in quadratische Stücke zerteilt (0.5 cm x 0.5 cm) und unter mehrfachem Pufferwechsel (Boratpuffer, 100 mmol/l, pH 8.9) 48 h gewaschen. Mit der Polymerisation verbunden war offensichtlich eine Desintegration von Berberis Zellen, da sich vakuoläre Protoberberine auswaschen ließen. Zur Bestimmung der STOX-Aktivität wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben 5.0 g polymerisierter Berberis Zellen in 10 ml Boratpuffer mit (S)-Norretikulin (0.2 mmol/l) bei 25°C mit 180 Upm geschüttelt (IKA Vibrax VXR, Jahnke und Kunkel) und die Extinktionszunahme der Lösung kinetisch bestimmt. Als Kontrolle diente ein vergleichbarer Ansatz ohne Substrat. Auf die polymerisierte Menge Berberis Zellen bezogen wurde eine STOX-Aktivität von 31 pkat/g Frischgewicht (910 pkat/g Trockengewicht) gemessen. Die im Standardzellaufschluß

(II. 5.2, XAD) präparierbare STOX-Aktivität des gleichen Gewebes betrug 0.60 nkat/g Frischgewicht (17.6 nkat/g Trockengewicht). Die in Polyacrylamid einpolymerisierten Berberis Zellen zeigen demnach noch 5.2% der möglichen STOX-Aktivität.

Die Immobilisierung ganzer Zellen oder komplex zusammengesetzter Enzymlösungen ist nur dann sinnvoll, wenn das immobilisierte Produkt keine unerwünschten Nebenreaktionen katalysiert. Um die Biotransformationsleistung der polymerisierten Zellen zu analysieren, wurde das Polymerisat mit (S)-(^{14}C -N)-Retikulin, (R)-(^{14}C -N)-Retikulin in Gegenwart und Abwesenheit von (^{14}C)-S-Adenosylmethionin inkubiert. In einem Borat-gepufferten (0.1 mmol/l, pH 8.9) Gesamtvolumen von 10 ml enthielten die Ansätze jeweils 3.0 g polymerisierte Berberis Zellen, 0.06 mmol/l des jeweiligen Retikulinenantiomeren (8.4×10^6 dpm) und zum Teil markiertes S-Adenosylmethionin (5.2 $\mu\text{mol/l}$, 50×10^6 dpm). Die Ansätze wurden nach 48 h (25°C) 4 mal über eine XAD-2-Säule (0.78 cm² x 20 cm) rezirkuliert, mit Methanol eluiert und dünn-schichtchromatographisch analysiert (Laufmittel 4,5 - in II. 14). Außer 1,2-Dehydroretikulin fand sich kein weiteres Produkt. Methylierungen wurden nicht beobachtet. Ebenfalls nur ein Produkt (1,2-Dehydronorretikulin) wurde bei Inkubation mit (S)-Norretikulin gefunden. Die Aktivität eines Biokatalysators kann durch die Anwesenheit niedermolekularer Inhibitoren wesentlich beeinträchtigt werden. Untersuchungen zur Hemmbarkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase hatten gezeigt, daß hohe Wasserstoffperoxid Konzentrationen die Enzymaktivität verringern (II. 3.12). In vivo wird das schädliche H_2O_2 in der Regel von Katalase in O_2 und H_2O gespalten. Eine Katalaseaktivität der immobilisierten Berberis Zellen wäre unter diesem Gesichtspunkt günstig. Bei Inkubation von polymerisierten Berberis Zellen mit H_2O_2 (10 mmol/l in 0.1 mol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.6) ließen sich Gasbläschen auf der Oberfläche des Polymerisats erkennen, welches auf die enzymatische O_2 ex H_2O_2 Bildung hinweist. Quantifizierung der Katalase ergab eine Aktivität von 0.40 nkat/g immobilisierter Berberis Zellen (Frischgewicht). Die beschrie-

bene Immobilisierung von Berberis Zellen führt also zu einem Produkt mit (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase und Katalase Aktivität. Störende Nebenaktivitäten konnten nicht nachgewiesen werden.

5.1.2 Immobilisierung zellfreier STOX-Präparationen

Nachdem die Immobilisierung ganzer Zellen hinsichtlich der Enzymaktivitätsausbeuten keine optimalen Ergebnisse erbracht hatte, wurde mit der breiten Palette verfügbarer Protein-Immobilisierungstechniken versucht, die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase auf zellfreier Ebene in immobilisierter Form zu präparieren. Die verschiedenen Verfahren umfaßten Einschlußverfahren, Enzymquervernetzung, Affinitätskopplung an Antikörper und kovalente Bindungen über verschiedene funktionelle Gruppen des STOX-Proteins. Die Präparationen und die mit den einzelnen Techniken erzielbaren Ausbeuten sollen kurz dargestellt werden.

Zum nicht-kovalenten Einschluß in Ca-Alginat wurde 1 ml STOX (35-fach angereichert; 0.25 nkat; 1 nkat/mg) mit 5 ml einer wässrigen 5%igen Alginatlösung (Natriumalginat Typ IV, Sigma) verrührt und die Lösung durch eine Spritzenkanüle in eine gekühlte wässrige CaCl_2 -Lösung (0.1 mol/l; 100 ml, leicht rühren) eingetropft. Die durch die augenblickliche Alginatvernetzung gebildeten Kügelchen wurden zur Aushärtung noch 4 h weitergerührt, mit Boratpuffer (0.1 mol/l, pH 8.9) gewaschen und die Enzymaktivität bestimmt. Dazu wurden 4.5 ml STOX-Alginatkügelchen in einem Gesamtvolumen von 14 ml mit (S)-Norretikulin (0.45 mmol/l) inkubiert und über die Zunahme der Extinktion (340 nm) im Medium die enzymatische Oxidationsrate exakt bestimmt. Mit der zur Immobilisierung verwendeten STOX-Präparation verglichen, zeigte das Ca-Alginatpräparat noch eine Enzymaktivität von 9.7%. Nach 7.5 Tagen war die Enzymaktivität noch voll erhalten. Eine Auswaschung des STOX-Proteins konnte nicht festgestellt werden.

Je nach dem Gehalt des Proteins an zugänglichen Aminofunktionen (insbesondere Lysinreste) lassen sich Proteinmoleküle untereinander durch das bifunktionelle Reagenz Glutardialdehyd verbrücken. Ob lösliche oder unlösliche

Komplexe ausgebildet werden, entscheidet der Lysingehalt der Proteinlösung, welcher sich durch Zugabe eines Lysinreichen Hilfsproteins (Albumin, Hämoglobin, Fibrinogen) erhöhen läßt (BROUN, 1976). Zur intermolekularen Quervernetzung wurden 20 ml eines alkaloidfreien STOX-Rohextrakts (9.5 nkat; 1.2 nkat/mg) mit Rinderserumalbumin auf einen Proteingehalt von 5% eingestellt und nach Zugabe einer Kaliumphosphat-gepufferten Glutardialdehydlösung (2 ml, 5% w/v, pH 7.0) auf eine Glasplatte ausgegossen (20 x 20 cm). Nach 12 h bei 25°C hatte sich eine bernsteinfarbene Folie gebildet. Ein identischer Ansatz wurde nach Glutardialdehydzugabe bei -20°C eingefroren und langsam aufgetaut. Es bildete sich ein festes schwammartiges Proteinnetzwerk. Beide Präparationen wurden in Glycin /NaOH-Puffer (0.1 mol/l, pH 8.9) gewaschen und zur Bestimmung der STOX-Aktivität mit (S)-Norretikulin inkubiert. Keine der beiden Präparationen zeigte Enzymaktivität. STOX-Folie wie-Schwamm hatten sich nach 5 Tagen aufgelöst. Das chemisch aggregierte STOX ist in dieser Form also kein geeigneter Biokatalysator.

Inkubation einer mit spezifischen Anti-STOX-Antikörpern kovalent verbundenen Matrix mit einer STOX-haltigen Proteinlösung führt zur Ausbildung nicht-kovalenter Antigen/Antikörper-Komplexe. Eine Verknüpfung dieser Komplexe mit Dimethylsuberimidat ergibt stabil immobilisiertes STOX. Zur kovalenten Kopplung von STOX an monoklonale Anti-STOX-Antikörper, welche die STOX-Katalyse nicht hemmten, wurden 10 ml eines STOX-haltigen alkaloidfreien Rohextrakts (7.9 nkat; 1 nkat/mg) 20 h lang mit 18 ml/h über eine Affinitätschromatographiesäule gepumpt (0.64 cm² x 3.3 cm; III. 2.7), nachgewaschen (10 ml 0.2 mol/l Triethanolamin/HCl-Puffer, pH 8.5) und weitere 15 h mit Dimethylsuberimidat (9.2 mg/ml Waschpuffer) inkubiert. Das Gel wurde 30 Min. mit 0.85% NaCl gewaschen und in Boratpuffer (0.1 mol/l, pH 8.9) äquilibriert. Zur Bestimmung der gebundenen katalytischen Aktivität wurde in einem geschlossenen Kreislauf (15.6 ml Flüssigkeit) kontinuierlich Substrat (67 µmol/l R,S-Canadin in 0.1 mol/l Boratpuffer, pH 8.9) durch die Säule gepumpt (18 ml/h) und die Zunahme der Extinktion (345 nm) verfolgt. 49 pkat Enzymaktivität pro ml Gel wurden

gemessen. Die Aktivitätsausbeute, bezogen auf die gekoppelte STOX-Menge (um den Alterungsverlust korrigierte Differenz der STOX-Aktivitäten vor und nach Kontakt mit der Affinitätsmatrix) betrug 1.7%. Der hohe Aufwand zur Präparation der Affinitätsmatrix und die geringen Aktivitätsausbeuten des immobilisierten Enzyms lassen dieses Verfahren alles andere als eine geeignete Immobilisierungsmethode erscheinen.

Die verschiedenen funktionellen Gruppen der Aminosäurereste erlauben die kovalente Verbindung jedes Proteins mit einer geeignet derivatisierten Matrix. Zur Immobilisierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase über seine Carboxyl-funktionen wurde ein Aminohexyl-substituiertes Gel verwendet (AH-Sepharose 4 B, Pharmacia). Die Kopplung erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll in Gegenwart von Carbodiimid. Dazu wurden 0.5 ml STOX (58-fach angereichert, 0.65 nkat; 0.92 nkat/mg) bei pH 6.8 in Gegenwart von EDC (N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid; 0.1 mol/l Endkonzentration) mit 220 mg gequollenem Gel über Nacht (10 h) inkubiert, gewaschen (0.1 mol/l Boratpuffer, pH 8.9; 0.1 mol/l Citrat /Phosphat-Puffer, pH 3.8; H₂O) und in Boratpuffer äquilibriert. Zum optischen Test der gebundenen Enzymaktivität wurde eine (S)-Norretikulinlösung - wie beschrieben - kontinuierlich über das Gel gepumpt. Die Aktivität des immobilisierten STOX betrug, verglichen mit gelöstem Enzym, 7.8%. Nach 6 Tagen zeigte das Gel noch 30% der Ausgangsaktivität.

Die Verwendung von Epoxy-aktivierter Sepharose 6B (Pharmacia) erlaubt die Kopplung von Liganden mit Hydroxyl-, Thiol- oder Aminogruppen. 0.3 ml STOX (58-fach angereichert, 0.40 nkat; 0.92 nkat/mg) wurden mit 1.5 ml Gel in einem Gesamtvolumen von 2 ml bei pH 8.9 (Boratpuffer) 32 h (27°C) inkubiert. Das Gel wurde gewaschen (0.1 mol/l Citrat /Phosphat-Puffer, pH 4.4; 0.1 mol/l Boratpuffer, pH 8.9) die reaktiven Gruppen abgesättigt (1 mol/l Äthanolamin, pH 9; 4 h) und die gebundene STOX-Aktivität gemessen. Wieder wurde dazu Substrat in einem geschlossenen Kreislauf durch das Gel gepumpt (2 mmol/l (S)-Norretikulin; 2.7 ml Flüssigkeit) und die Extinktionsänderung (340 nm) photometrisch bestimmt. Verglichen mit gelöstem STOX zeigte das an Epoxy-

aktivierte Sepharose 6B gebundene Enzym nur noch 1.4% seiner Aktivität. Doppelt so hohe Ausbeuten (3.1%) wurden durch Verwendung der ähnlich substituierten Oxiran-Acrylharzmatrix Eupergit C (Röhm Pharma, Weiterstadt) erhalten. In Anlehnung an die Vorschrift von HANNIBAL-FRIEDRICH et al. (1980) wurden dazu 4 ml Phosphat-gepufferte (0.5 mol/l, pH 7.5) STOX-Lösung (6-fach angereichert, 1.29 nkat; 1.60 nkat/mg) mit Rinderserumalbumin auf einen Proteingehalt von 1.25% eingestellt und 48 h lang mit 250 mg Eupergit C-Kügelchen bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gel wurde mit Phosphatpuffer gewaschen (0.1 mol/l, pH 7.5) und die Aktivität des gebundenen Proteins in einem geschlossenen Kreislauf - wie beschrieben - bestimmt.

Keinen Erfolg hatte die über Aminofunktionen erfolgende Kopplung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase an CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia; AXEN et al., 1967), wie sie für pflanzliche Sekundärstoffenzyme bereits erfolgreich eingesetzt worden war (PFITZNER und ZENK, 1982).

Trifluoräthansulfonsäure-aktivierte Träger können unter sehr milden Bedingungen stabile Bindungen mit Amino- und Thiolgruppen eingehen. Nach dem von NILSSON und MOSBACH (1981) vorgeschlagenen Verfahren wurden 4.3 ml gequollene Tresyl-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) mit 10 ml STOX (3.82 nkat, 0.27 nkat/mg) bei Raumtemperatur 12 h lang unter leichtem Schwenken (180 Upm) inkubiert (in 0.1 mol/l Boratpuffer, pH 8.9; 0.2 mol/l NaCl). Das Gel wurde gewaschen, die Menge an ungebundenem STOX bestimmt. Nach Absättigung der verbliebenen aktivierten Reste (0.1 mol/l Glycin/NaOH, pH 8.3) wurde das Gel in Boratpuffer äquilibriert (0.1 mol/l, pH 8.9) und die gebundene STOX-Aktivität mit (S)-Norretikulin im optischen Test - wie oben beschrieben - bestimmt. Die Kopplungsrate (Protein) betrug 40.3%. Verglichen mit freiem Enzym zeigte das an Tresyl-aktivierte Sepharose gebundene Enzym noch 17.8% seiner Aktivität.

Protein-ständige Aminogruppen können mit Aldehyden leicht zu einer Schiff'schen Base reagieren. Trägermaterialien mit freien Aldehydgruppen sind kommerziell erhältlich,

lassen sich aber auch einfach selbst darstellen. WEETALL hatte 1976 ein zweistufiges Verfahren beschrieben, bei welchem Glasoberflächen mit Amino-substituierten Silanen behandelt werden und anschließend mit Glutardialdehyd zu einer Aldehyd-tragenden aktivierten Matrix umgesetzt werden. 2 g Controlled Pore Glass (CPG - 10, 120 - 200 mesh; Serva, Heidelberg) wurden dazu 2.5 h bei 75°C in 40 ml wässriger, saurer (pH 3-4 mit 6N HCL) γ -Aminopropyltriethoxysilan-Lösung (0.4 ml/40 ml; Sigma, München) umgesetzt. Das silanisierte Glas wurde anschließend abfiltriert, gewaschen (H_2O) und bei 110°C 12 h lang getrocknet. Zur Einführung der Aldehydgruppe wurde 1 g silanisiertes Glas in 25 ml 2.5%igem Glutardialdehyd (in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.3) 1.5 h bei 25°C inkubiert, wobei sich das Gel orangebraun verfärbte. Das aktivierte Glas (2.7 ml) wurde bis zur völligen Geruchsfreiheit mit Wasser gewaschen, der Überstand verworfen und 3ml STOX zugegeben (5-fach angereichert; 6.3 nkat, 0.71 nkat/mg). Der Ansatz wurde 3 h auf einem Schüttler geschwenkt (90 Upm), mit Puffer nachgewaschen und STOX-Aktivität wie Proteingehalt der Waschlösung zur Berechnung der theoretischen Kopplungsrate bestimmt. Zur Aktivitätsbestimmung der an die Glasmatrix gekoppelten (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (CPG-STOX) wurde die 2.7 ml Glassuspension in Boratpuffer (0.1 mol/l, pH 8.9) äquilibriert und in einem Gesamtvolumen von 3.2 ml mit (S)-Norretikulin (1 mmol/l) inkubiert. Unter ständigem Schwenken wurden dem Ansatz in regelmäßigen Abständen (2 Min.) Proben entnommen und nach Absetzen der Glasmatrix die Zunahme der Extinktion (340 nm) im Überstand bestimmt. Als Kontrolle diente ein vergleichbarer Ansatz mit (R)-Norretikulin. Das immobilisierte STOX zeigte noch 13.7% der Aktivität des gelösten Enzyms. Die Proteinkopplungsrate betrug 76%.

Die mit den unterschiedlichen Methoden erzielten STOX-Aktivitätsausbeuten sind in Tabelle 15 noch einmal zusammengefaßt. Eine klar favorisierbare funktionelle Gruppe für die STOX-Immobilisierung läßt sich daraus nicht ersehen. Die drastischen Differenzen bei der Verwendung von CNBr- und Tresyl-aktivierter Sepharose, mit ihren überlagernden Bindungsspezifitäten, deuten eventuell darauf hin, daß SH-

STOX- Präparation	Immobilisie- rungsprinzip	Immobilisie- rungsverfahren	STOX- Aktivität (rel.%)	Protein gebunden (%)
ganze Zellen	Polymerisation	Polyacrylamid	5.2	85
Zellfrei	Einhüllung	Ca ⁺⁺ -Alginat	9.7	90
	Kovalente Trägerbindung	Tresyl-aktiv. Sephärose	17.8	40
		CPG - 10	13.7	76
		AH-Sephärose	7.8	86
		Eupergit C	3.1	80
		Antikörper/ Sephärose	1.7	-
		Epoxy-aktiv. Sephärose	1.4	89
		CNBr-aktiv. Sephärose	0	92
	Quervernetzung	Glutardialdehyd	0	-

Tabelle 15

Immobilisierung intakter Zellen (Berberis) und zellfreier STOX-Präparationen in verschiedenen Verfahren nach unterschiedlichen Immobilisierungs-Prinzipien. Die Enzym-Aktivitäten sind auf die Aktivität von gelöst vorliegendem STOX (100) bezogen. Alle Verfahren und Testmethoden sind im Text genau ausgeführt.

Gruppen eine günstige Kopplungsfunktion darstellen. Die guten STOX-Aktivitätsausbeuten mit Glutaraldehyd-aktiviertem Glas lassen diesen Träger als bestgeeigneten für STOX erscheinen, zumal die physikalischen Eigenschaften der anorganischen Matrix gegenüber den kompressiblen und quellbaren Polysacchariden für technische Zwecke vorteilhaft wären. Versuche, die Aktivitätsausbeuten durch Variation der eingesetzten Proteinkonzentration (0.2 - 1.6 mg/ml) zu erhöhen, erbrachten keine weitere Zunahme.

Wie eingangs des Kapitels beschrieben, sollte die Immobilisierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase auch im Hinblick auf ein Verfahren betrieben werden, bei welchem enzymatische Oxidation und chemische Reduktion (NaBH_4) zusammenspielen. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die STOX-Matrix mit BH_4^- in Berührung kommen könnte. Um den Einfluß von NaBH_4 auf das Glas-immobilisierte Enzym abschätzen zu können, wurden 1.5 ml CPG-STOX in einer Borat-gepufferten Lösung (0.1 mol/l, pH 8.9) mit 50 mmol/l NaBH_4 inkubiert und das Reduktionsmittel nach 12 h ausverdünnt. Ein Vergleich mit unbehandeltem CPG-STOX im optischen Test (1.5 ml CPG-STOX in 3.8 ml Boratpuffer 0.1 mol/l; 0.25 mmol/l (S)-Norretikulin) ergab keinerlei Unterschied. Da die Reduktion der Schiff'schen Basen, welche sich zwischen Protein-ständigen Amino- und Matrix-eigenen Aldehydgruppen ausbilden, sich auf die Enzymaktivität nicht nachteilig auswirkte, wurden alle weiteren CPG-STOX Präparationen zur Stabilisierung der STOX-Bindung mit NaBH_4 reduziert.

Der optimale Einsatz eines immobilisierten Enzyms ist nur bei möglichst genauer Kenntnis der Eigenschaften des Katalysators unter genau definierten Bedingungen möglich, wobei sich in der Regel das gelöste Enzym und sein immobilisiertes Pendant in einigen Charakteristika unterscheiden.

5.2 Vergleichende Untersuchung von immobilisiertem und löslichem STOX

5.2.1 Stabilität

Es läßt sich fast kein Beispiel finden, bei welchem die Immobilisierung eines Enzyms ohne Verlust an Aktivität

erreicht werden konnte. Dieser Nebeneffekt kann allerdings leicht in Kauf genommen werden, wenn das immobilisierte Enzym eine signifikant höhere Stabilität zeigt, d.h. eine Aktivitätsausbeute einer Immobilisierung von 20% wird durch eine 5-fache Lebensdauer des immobilisierten gegenüber dem löslichen Enzym kompensiert, noch längere Verwendbarkeit macht die Verluste bedeutungslos.

Drei verschiedene STOX-Präparationen wurden auf ihre Lagerstabilität hin untersucht: lösliches Enzym, immobilisiertes Enzym (CPG-STOX) und immobilisierte Berberis Zellen (Polyacrylamidpolymerisat). Die lösliche Enzympräparation (Matrex Blue A Eluat, III. 2.5; 0.89 nkat/mg) wurde sterilfiltriert und bei 25°C, bei 4°C und - in Gegenwart von 25% Glycerin - bei -25°C aufbewahrt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test. Die Präparation des Ganzzellpolymerisats wie des Glas-immobilisierten Enzyms mit den jeweiligen optischen Tests sind in III. 5.1 beschrieben worden. Wie Abbildung 52 zeigt, erhöht sich die Lagerstabilität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase durch die Immobilisierung beträchtlich. Während bei Raumtemperatur das lösliche Enzym nach 4 Tagen nur noch 50% seiner Ausgangsaktivität zeigt, erreichen die polymerisierten Zellen diesen Wert erst nach 30, das Glas-immobilisierte STOX gar erst nach 200 Tagen. Noch längere Standzeiten zeigt das immobilisierte Enzym bei 4°C (355 Tage), wobei es keine Rolle spielt, ob der CPG-STOX-Komplex mit NaBH_4 reduziert wurde oder nicht. Nach 102 Tagen Lagerung des gelösten Enzyms bei -25°C in Gegenwart von 25% Glycerin waren noch 50% der Aktivität erhalten. Für die erhöhte Stabilität der immobilisierten Formen lassen sich zahlreiche Gründe denken. So ist die Zugänglichkeit für Mikroorganismen erschwert, ungünstige Umfaltungen sind durch die kovalente Anheftung an die Trägermatrix nicht möglich, Proteasen wurden selbst mit immobilisiert oder können ausgewaschen werden, etc. (vgl. dazu KLIBANOV, 1979). Die relativ geringen Ausbeuten bei der Immobilisierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase werden durch die drastisch erhöhte Stabilität der immobilisierten Form bei weitem kompensiert, was letztere für die biotechnologische Applikation klar favorisiert.

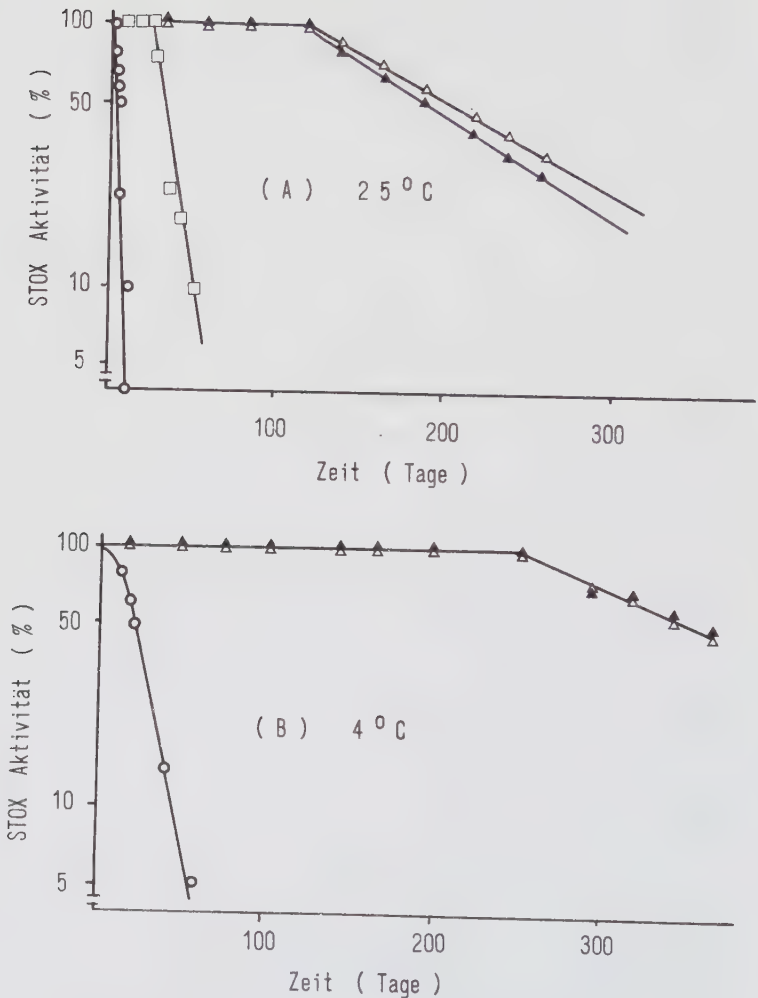


Abbildung 52

Lagerstabilität verschiedener Präparationen der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase bei 25°C (A) und 4°C (B). Das Diagramm zeigt die unterschiedliche Stabilität der Aktivitäten des sterilfiltrierten löslichen Enzyms (o—o), des an CPG-10 immobilisierten Enzyms (mit ▲—▲ und ohne △—△ NaBH₄-Reduktion) und von in Polyacrylamid einpolymerisierten ganzen Berberis-Zellen (□—□). Die Enzymaktivitäten wurden im optischen Test bestimmt.

5.2.2 Temperatur - Optimum

Die kovalente Anheftung von Proteindomänen an eine rigide Matrix kann die zur optimalen katalytischen Aktivität nötige Flexibilität eines Enzyms beeinträchtigen. Darüber hinaus ist allerdings bei erhöhter Zufuhr thermischer Energie auch denkbar, daß durch eben diese verringerten Freiheitsgrade sich das Enzym nicht so leicht wie sein gelöst vorliegendes Pendant in eine katalytisch inaktive Konformation umlagern wird. Für das gelöste Enzym wurde die maximale katalytische Aktivität bei 40°C gemessen (III. 3.6). Zur Messung des Temperatur-Optimums des immobilisierten CPG-STOX wurden je 200 µl CPG-STOX Suspension in 1.2 ml Gesamtvolumen (0.1 mol/l Boratpuffer, pH 9.4) mit (S)-Norretikulin (0.26 mmol/l) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, und die Zunahme der Extinktion (340 nm) im Überstand kinetisch bestimmt. Kontrollen enthielten (R)-Norretikulin. Die Temperaturabhängigkeit der STOX-Aktivität Polyacrylamid-polymerisierter Berberis-Zellen wurde in 6 ml Ansätzen mit je 1.9 g Ganzzellpolymerisat im optischen Test mit (S)-Norretikulin (0.1 mmol/l) bei pH 8.9 (0.1 mol/l Boratpuffer) durchgeführt. Abbildung 53 faßt die Ergebnisse zusammen. Das Temperatur-Optimum wird durch die Immobilisierung in den Bereich höherer Temperatur verschoben, was auf den stabilisierenden Effekt der eingeschränkten Beweglichkeit hinweist. Die wohl stärkere Fixierung des Proteins im CPG-STOX-Präparat drückt sich in dem gegenüber dem Ganzzellpolymerisat leicht erhöhten Temperatur-Optimum aus (CPG-STOX: 50°C; Berberis Zellen in Polyacrylamid: 47°C).

5.2.3 pH - Optimum

Die kovalente Fixierung von Enzymen erfolgt überwiegend über dissoziabile Gruppen der Aminosäurereste. Da diese oft an der Aufrechterhaltung der katalytisch aktiven Konformation beteiligt sind, kann ihre Blockierung über einen veränderten Ionisierungsgrad die Enzymaktivität beeinflussen. Hinzu kommt, daß das immobilisierte Enzym eine von der Hydrathülle des gelösten Proteins recht verschiedene Mikroumgebung besitzt, deren Ionisierungsgrad und Pufferkapazität sich ebenfalls auf die Enzymaktivität auswirken.

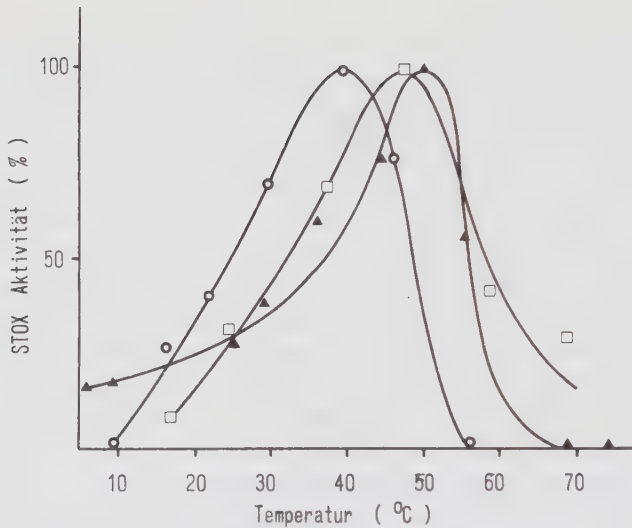


Abbildung 53 Vergleichende Darstellung der Temperatur-Optima von löslichem STOX (o—o), CPG-STOX (▲—▲) und immobilisierter Berberis-Zellen (□—□').

Die pH-Wert-abhängige Enzymaktivität von immobilisiertem STOX (polymerisierte Berberis Zellen, CPG-STOX) wurde mit Enzympräparationen durchgeführt, welche in Puffern unterschiedlicher Säuregrade äquilibriert worden waren (alle 0.1 mol/l). Die Ansätze entsprachen exakt denjenigen des vorhergehenden Kapitels (5.2.2). Bestimmt wurde wieder die zeitabhängige Extinktionszunahme im Überstand des Immobilisats. Die pH-Werte wurden direkt im Ansatz gemessen. Abbildung 54 vergleicht die relativen Enzymaktivitäten der beiden immobilisierten Formen mit dem bereits in III. 3.7 beschriebenen löslichen Enzym. Die pH-Optima der immobilisierten Enzymformen sind gegenüber dem gelösten STOX ins Alkalische verschoben (CPG-STOX pH 9.4; Berberis Zellen in Acrylamid pH 9.8). Da die Löslichkeit aller von STOX oxidierbaren Substrate im Sauren wesentlich besser ist als

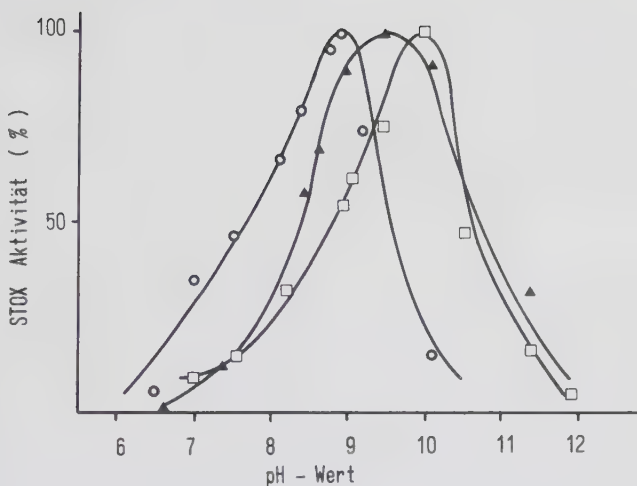


Abbildung 54 Vergleichende Darstellung der pH-Optima von löslichem STOX (o—o), CPG-STOX (▲—▲) und immobilisierten Berberis-Zellen (□—□).

im Alkalischen, ist eine Verschiebung des pH-Optimums ins Alkalische vom biotechnologisch-präparativen Gesichtspunkt aus jedoch ungünstig zu beurteilen.

5.2.4 Kinetische Parameter

Die gegenüber dem gelösten Enzym veränderten konformationellen Freiheitsgrade der immobilisierten Form können, im Zusammenspiel mit den unterschiedlichen topologischen, physikalisch-chemischen Eigenheiten der Matrix, die Michaelis Konstante und die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzym-katalysierten Reaktion beeinflussen. Konnte für die gelöst vorliegende (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase mit (S)-Norretikulin ein K_M -Wert von 0.15 mmol/l bei einer Maximalgeschwindigkeit von 0.12 nmol/s gemessen werden

(III. 3.11), wurde für das an CPG-10 immobilisierte STOX ein K_M -Wert von 0.12 mmol/l bei einem V_{max} von 2.1 nmol/s erhalten. Die Daten wurden in einem - wie beschrieben - durchgeführten optischen Test bei pH 8.9 (0.1 mol/l Boratpuffer mit (S)-Norretikulin als Substrat) erhalten. Während also die Affinität zum Substrat durch die Immobilisierung kaum beeinträchtigt wird, zeigt die immobilisierte Form eine 18-fach höhere Maximalgeschwindigkeit.

5.2.5 Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln

Die im Vergleich mit wässrigen Systemen gute Löslichkeit vieler Substrate in organischen Lösungsmitteln, die leichtere Produktisolierung und die Möglichkeit, ganz neue oder im Wässrigen kinetisch ungünstige Reaktionen beobachten zu können, machen die Verwendung dieser Lösungsmittel gerade für den biotechnologischen Einsatz von Enzymsystemen attraktiv. Da zudem das Enzymprotein selbst in der Regel unlöslich in organischem Lösungsmittel ist, lassen sich Katalysator und Produkte jederzeit leicht trennen.

Zur Solubilisierung schlecht löslicher Substrate genügt es häufig, geringe Mengen eines Wasser-mischbaren Lösungsmittels (Methanol, Äthanol, DMF, DMSO) zuzusetzen. Gerade in der mikrobiellen Steroidtransformation konnten solche wässrig-organischen Lösungsmittelsysteme erfolgreich eingesetzt werden (FUKUI und TANAKA, 1985). Auch die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zeigt bei 5% Lösungsmittelanteil (Methanol, Äthanol, DMF, DMSO) in wässrigem Milieu noch keine verminderte Aktivität. Bei 16% v/v N,N-Dimethylformamid (DMF) allerdings zeigt STOX nur noch 50% seiner Ausgangsaktivität und nur noch 2.5%, wenn das Lösungsmittel zur Hälfte aus DMF besteht. Auch die übrigen erwähnten Lösungsmittel zeigen, wenngleich nicht so drastisch, den gleichen Aktivitäts-mindernden Einfluß. Eine mögliche Erklärung liefern ZAKS und KLIBANOV (1985), welche nicht die Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem Enzym selbst, sondern mit seiner assoziierten Hydrathülle für die beobachtbaren Effekte verantwortlich machen. Demnach würden sich Wasser-mischbare Lösungsmittel bei vielen Enzymen als

ungünstiger erweisen als echte 2-Phasen-Systeme (Hydrathülle Enzym/organisches Lösungsmittel). Inwieweit dies auch für die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zutrifft, sollte mit einer wasserfreien STOX-Präparation in verschiedenen organischen Lösungsmitteln getestet werden. Nach dem von dieser Cambridger Arbeitsgruppe vorgeschlagenen Verfahren wurden zur Abtrennung überschüssigen Wassers 10 ml STOX (8.4 nkat, 8.2 mg Protein; 13-fach angereichert, pH 8.9) unter Eiskühlung durch Zugabe eines gleichen Volumenteils Aceton (-20°C) präzipitiert (45 Min. bei 4°C stehen), abzentrifugiert und der Niederschlag in Aceton gewaschen. Um die Oberfläche des STOX-Präzipitats möglichst groß zu gestalten, wurde diese Fällung in einem parallelen Ansatz in Gegenwart von 2 g Glaskugeln (125 - 200 µm, Serva, Heidelberg) durchgeführt. Ein Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten von gefälltem und ungefälltem STOX im optischen Standardansatz zeigte keine Aktivitätsverluste durch den Fällungsschritt. Die Wasserlöslichkeit des Aceton-gefällten Proteins erwies sich als äußerst schlecht.

Um die STOX-Aktivität des entwässerten Proteins in organischen Lösungsmitteln zu testen, wurden jeweils 0.2 g Aceton gefälltes STOX in 1 ml Lösungsmittel mit (S)-Norretikulin (25 mmol/l) bei 25°C inkubiert und die Zunahme der Extinktion (340 nm) im Überstand bestimmt. Die relativen Umsatzraten in verschiedenen organischen Lösungsmitteln zeigt Tabelle 16. Aceton und Essigester erscheinen dabei als die geeignetsten Lösungsmittel. Vergleicht man die Umsatzrate allerdings mit der Enzymaktivität im wässrigen System, so lassen sich mit Aceton als Lösungsmittel nur 0.2% dieses Wertes erreichen. Durch die Verwendung von Aceton-gefälltem STOX (CPG-STOX, Polyacrylamid-polymerisierte Berberis Zellen) läßt sich dieser Wert auf bis zu 5% des Referenzwertes im Wässrigen anheben. Wenngleich diese Werte für den präparativen STOX-Einsatz zu gering sind, zeigen diese Versuche, daß es prinzipiell möglich ist, die stereospezifische Benzylisochinolin-Oxidation in fast wasserfreier Umgebung enzymatisch mit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase durchzuführen.

Lösungsmittel	Enzymaktivität (rel. %)
Aceton	100
Essigester	22
Acetonitril	8
Toluol	5
Chloroform	1
Hexan	0.5

Tabelle 16

(S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase-Aktivität in organischen Lösungsmitteln. Die Enzym-Aktivität (rel. %) von Aceton-gefälltem STOX wurde im optischen Test mit (S)-Norretikulin bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 36 h, Inkubationstemperatur 25°C. In wässriger Umgebung ist STOX 500 mal aktiver als in Aceton.

5.3 Enzymatisch-chemische Überführung eines Norretikulin-Razemats in das (R)-Enantiomere

Die Möglichkeit, physikalisch untrennbare Razemate zu trennen und das gewünschte Produkt in optisch reiner Form zu erhalten, ist eine starke Triebfeder der biotechnologisch orientierten Forschung. Verfahren zur quantitativen Darstellung des erwünschten Enantiomeren, welche rein chemische Schritte mit der Stereospezifität von Enzymen koppeln, werden seit Jahren schon großtechnisch zur Aminosäureproduktion eingesetzt (CHIBATA et al., 1976). Die zu geringen Kenntnisse der an der Alkaloidbiosynthese und -transformation beteiligten Enzyme machte bis heute die Ausschöpfung dieses Potentials unmöglich.

Die erfolgreiche Immobilisierung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase und die gute Stabilität des immobilisierten Enzyms ließen an die präparative Darstellung des Norretikulin (R)-Enantiomeren aus razemischem Ausgangsmaterial denken. Als immobilisiertes Enzym wurde das an Glutardialdehyd aktiviertes Glas (CPG-10) gebundene STOX verwendet (vgl. 5.1.2). 1 ml des STOX-gekoppelten Glasträgers zeigte eine Enzymaktivität von 0.7 nkat. Eine wässrige Norretikulinlösung sollte über eine Säule mit CPG-immobilisier-

tem Enzym gepumpt werden. Während das (S)-Enantiomer dabei zur 1,2-Dehydroform oxidiert wird, sollte das (R)-Enantiomere die Säule unverändert passieren. Zugabe von NaBH_4 zum Eluat reduziert die Norretikulin-Iminiumform stereospezifisch zu der enzymatisch nicht oxidierbaren (R)-Form wie zum STOX-oxidierbaren (S)-Norretikulin. Nach Zerstörung des NaBH_4 sollte das durch die NaBH_4 -Reduktion gebildete (S)-Enantiomere in einem 2. Zyklus wieder enzymatisch oxidiert werden, ein Vorgehen, welches nach sechs Zyklen zu 99.2% reinem (R)-Norretikulin führen sollte. Der Kreisprozeß wurde auf zweierlei Weise quantitativ verfolgt. Die Messung der Extinktion des Eluats gestattete die photometrische Bestimmung des oxidierten Norretikulins ($\epsilon_{340} = 3.25 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$). Über Probenentnahmen (100 μl) vor und nach jedem Zyklus konnten mittels radioimmunologischer Bestimmung von (R)- und (S)-Norretikulin die Bildung des (R)-Enantiomeren wie der Verbrauch des (S)-Enantiomeren quantitativ bestimmt werden (vgl. II. 7.7). Zur Durchführung dieses Prozesses wurden bei Raumtemperatur 400 ml einer wässrigen Lösung von (R,S)-Norretikulin (7.1 mmol/l; pH 9.0 mit NaOH) über eine Säule mit immobilisiertem STOX gepumpt (4.52 $\text{cm}^2 \times 16 \text{ cm}$). Die Flußrate betrug 1.7 ml/Min. Nach 24 h konnte ein vollständiger (S)-Norretikulinumsatz gemessen werden. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen Wasser nachgewaschen und die Waschlösung mit dem stark gelb gefärbten Eluat vereinigt. Nach Zugabe von 100 mg NaBH_4 wurde die sich entfärbende Lösung 2 h weitergerührt, bis photometrisch keine Extinktionsabnahme mehr messbar war (340 nm). Bevor ein neuer Zyklus gestartet werden konnte, wurde überschüssiges NaBH_4 durch Ansäuern des Ansatzes auf pH 2 mit 6 N HCl zerstört, und die Lösung mit NaOH auf den Ausgangs-pH-Wert von 9.0 zurücktitriert. Mit dem nun etwas größeren Substratvolumen wurde der Vorgang von neuem gestartet. Sechs Zyklen wurden wie beschrieben durchgeführt, statt 100 mg wurden ab dem 2. Zyklus nur mehr 50 mg NaBH_4 verwendet. Abbildung 55 zeigt die Abnahme des (S)-Norretikulins im Verlauf der sechs Zyklen. Berechnet wurden diese Mengen aus der in jedem Zyklus gemessenen und volumenkorrigierten Extinktionszunahme, welche unmittelbares Maß

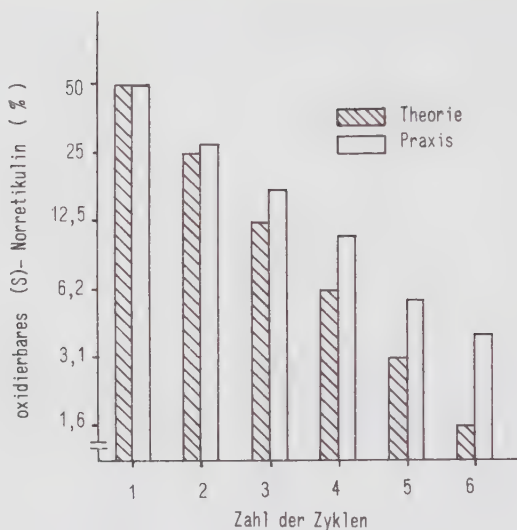


Abbildung 55

Abnahme des (S)-Norretikulingehalts einer racemischen Substratlösung, welche in 6 gleichen Zyklen über eine Säule mit immobilisiertem STOX gepumpt worden war. Nach jedem Säulendurchlauf wurde die Säule nachgewaschen und das aus (S)-Norretikulin gebildete 1,2-Dehydronorretikulin im Eluat mit NaBH_4 reduziert. Aus der photometrisch bestimmbaren BH_4 -bedingten Extinktionsdifferenz wurde der oxidierbare (S)-Norretikulinanteil berechnet. Die halblogarithmische Auftragung zeigt, daß die theoretischen Werte nicht erreicht werden. Ursachen werden im Text erläutert.

für die Menge an enzymatisch umsetzbarem (S)-Norretikulin ist. Augenfällig ist, daß bereits ab dem 2. Zyklus die vorhersagbaren und die praktisch gemessenen Werte differieren. Mehrere Gründe lassen sich dafür anführen. Schon im 3. Zyklus liegt ein fast 10-facher Überschuß des (R)-Enantiomeren vor, was zu einer reduzierten STOX-Aktivität führen könnte. Dazu kommt, daß in den letzten Zyklen das Enzym möglicherweise nicht mehr unter Substratsättigung arbeiten kann. Nicht abschätzen läßt sich der Einfluß einer festgestellten Verunreinigung des mir zur Verfügung gestellten (R,S)-Norretikulins. Mit Sicherheit ist allerdings ein wesentlicher Grund der Abweichungen im Trägermaterial selbst zu suchen. So erwies es sich als außerordentlich schwierig, das gebildete 1,2-Dehydronorretikulin vollständig aus der Glasmatrix herauszuwaschen. Da dazu weit mehr als das 10-fache des Säulenvolumens an Wasser nötig war, mußte durch die Begrenzung des Nachwasches auf ein Säulenvolumen wegen der nur unvollständigen Auswaschung des oxidierten Produkts mit einer Abweichung von der Ideallinie gerechnet werden. Im Gegensatz zu diesen indirekten photometrischen Messungen des Enantiomerenverhältnisses läßt sich radioimmunologisch das Verhältnis von (R)- und (S)-Norretikulin direkt bestimmen. Abbildung 56 zeigt in einem 10-fach verkleinerten Ansatz die von der Abnahme des (S)-Norretikulins begleitete Zunahme des (R)-Enantiomeren. Nach 6 Zyklen wurde ein Enantiomerenverhältnis (R/S) von 97.5 : 2.5 gemessen. Der theoretische Wert nach 6 Zyklen beträgt 99.2 : 0.8. Da das (S)-Enantiomere eine leichte Kreuzreaktion in dem Radioimmunistest zur Bestimmung des (R)-Enantiomeren zeigt (WIECZOREK, 1984), ist der (R)-Anteil wahrscheinlich noch geringfügig höher. Während die hohe Empfindlichkeit der radioimmunologischen Analyse die Messung sehr verdünnter Proben erlaubt, sind zur Bestimmung vieler Substanzcharakteristika Milligramm-Mengen erforderlich. Zur Konzentrierung der nach 6 Zyklen erhaltenen verdünnten Produktlösung wurde das Säulenuat in einer Säule mit XAD adsorbiert (Typ 2, 33.2 cm² x 8.5 cm) und das konzentrierte Eluat (saures Methanol) dickschichtchromatographisch (Laufmittel 5, II. 14) gereinigt (40% Substanzausbeute). Das Produkt war hinsichtlich seines UV- und Massenspektrums identisch mit Norreti-

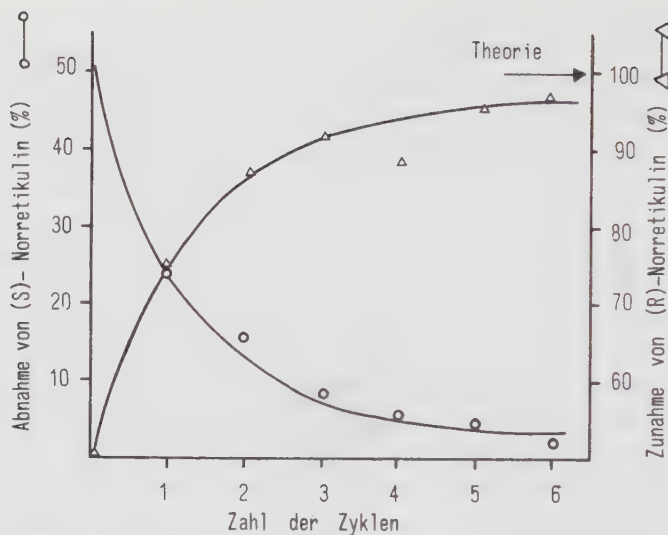


Abbildung 56

Zu- und Abnahme der Norretikulinenantiomere bei wiederholter Oxidation von (S)-Norretikulin durch immobilisiertes STOX, verbunden mit stereounspezifischer NaBH_4 -Reduktion. Die Messung erfolgte zu Beginn eines jeden Zyklus mittels der von WIECZOREK (1984) entwickelten Radioimmuntests zur Bestimmung von (R)- und (S)-Retikulin.

kulin . UV (Methanol) λ_{max} 282 nm; CI - MS m/z (rel. Int. %) 315 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100). Gegenüber dem in der Literatur (BATTERSBY et al., 1966) angegebenen Drehwert von $+13.3^\circ$ für (R)-Norretikulin zeigt das enzymatisch-chemische Produkt einen etwas höheren Wert von $+21.3^\circ$ ($c = 1.36$; Methanol).

Die erfolgreiche Überführung eines Norretikulin-Razemats in das optisch reine gewünschte (R)-Enantiomere zeigt, daß sich das biotechnologische Potential der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase tatsächlich sinnvoll ausnützen läßt (AMANN et al., 1984). Der versuchte Übergang vom Milligramm- in den Grammereich ließ allerdings deutlich einige Schwierigkeiten sichtbar werden. Zur weiteren Optimierung sollten daher andere Trägerformen gefunden werden. Ein

Durchbruch wäre allerdings erreicht, würde die Reduktion des 1,2-Dehydronorretikulins asymmetrisch erfolgen. Eine stereoselektive oder gar -spezifische Reduktion der Dehydroverbindung könnte den geschilderten Prozeß drastisch verkürzen, da die Rezirkulation des reduzierten Produkts wegfallen könnte. Zwei Möglichkeiten wären dazu denkbar, eine biologische und eine chemische. Der biologische Weg bestünde im Einsatz eines tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Enzymsystems, welches die stereospezifische Reduktion katalysieren könnte, wie sie für andere Verbindungen, z.B. in Hefen, gefunden werden (NAKAMURA et al., 1984). Die Reduktionsäquivalente könnten dabei elektrochemisch zur Verfügung gestellt werden. Die elektrochemische Reduktion per se würde stereochemisch keinen Vorteil gegenüber NaBH_4 bedeuten. Vorversuche hatten zudem gezeigt, daß eine elektrochemische Reduktion von 1,2-Dehydronorretikulin zu einer ganzen Reihe von Nebenprodukten führt (pers. Mitteilung Dr. Günther, Garching). Die chemische stereoselektive Reduktion scheint möglich zu sein. SZANTAY et al. konnten 1983 mit dem chiralen Natriumborhydrid-Derivat (D)-(+)-N-Benzyl-oxycarbonylprolin ein Enantiomerenverhältnis (R/S) nach 1,2-Dehydronorretikulin-Reduktion von 8 : 2 erreichen.

Der Einsatz von STOX könnte somit einen kleinen Fortschritt in der synthetischen Darstellung des Morphins bedeuten. Könnte nun noch der enzymatische oxidative Kopplungsschritt geklärt werden, welcher das 1-Benzylisochinolin-Skelett zum Phenanthrengerüst umbaut, wäre das Problem "Morphinsynthese" weitgehend gelöst. Die pflanzlichen Zellkulturen halten mit Sicherheit den Schlüssel dazu bereit.

IV. DISKUSSION

Diskussionen über die Biologie der Alkaloide enden meist mit teleologischen Mutmaßungen. Ist die phylogenetische Herkunft der Alkaloide schon unklar, deutet sich der Sinn und Zweck dieser Stoffgruppe für den pflanzlichen Organismus bislang nur im Wechselspiel mit der übrigen belebten Umwelt an (HARTMANN, 1985). Neben der uns wohlverstandenen morphologischen Vielfalt der Blüten, der Blätter und aller anderen pflanzlichen Organe sollte die Evolution auf einer vergleichsweise viel niedrigeren Komplexitätsstufe die unterschiedlichsten Molekülformen hervorgebracht haben. Während einige dieser Verbindungen die Attraktivität ihres Besitzers für Insekten steigerten, was durch die damit verbundene Möglichkeit der sexuellen Fortpflanzung den Fortbestand dieser Art sicherte, waren andere Alkaloide besser geeignet, ihre Pflanzen, welche ja tierischen Organismen zum großen Teil als Nahrungsquelle dienen, unschmackhaft zu machen. Der Selektionsvorteil für Organismen, welche diese pflanzlichen Fraßschutzsubstanzen positiv für ihre eigene ökophysiologische Situation ausnutzen konnten, führte zur Koevolution unterschiedlichster Pflanze /Tier-Systeme (FRAENKEL, 1959; HARBORNE, 1982). Die gegenüber den tierischen Organismen recht eingeschränkten Exkretionsmechanismen der Pflanze lassen die Alkaloide auch als Verbindungen zur Festlegung von Stickstoff erscheinen. Inwieweit diese zumeist in eigenen Kompartimenten abgelagerten Verbindungen wieder mobilisiert werden, ist jedoch unklar (GOODWIN, MERCER, 1983).

Welchen Zweck nun erfüllen die Protoberberine in der Pflanze? Für Machonia trifoliata konnte gezeigt werden, daß das überwiegend in den unterirdischen Pflanzenteilen vorkommende Berberin die Pflanze vor Pilzbefall schützt (Phymatrichum omnivorme). Darüber hinaus wurde über eine Keimungshemmung durch Berberin berichtet, welche es gerade recht langsam wachsenden Arten (Coptis japonica) ermöglicht, die Entwicklung benachbarter Konkurrenzpflanzen zu verhindern (MOTHES et al., 1985). Solche allelopatischen Effekte wer-

den für zahlreiche Alkaloide (Coffein) und andere Sekundärstoffe beschrieben (FRIEDMAN, WALLER, 1985). Komplexer wird dieses Bild, betrachtet man nicht allein die fertigen Protoberberine, sondern auch deren Biosynthese. Sie erscheint als eine Möglichkeit, Wasserstoffperoxid zu generieren (STEFFENS et al., 1985; AMANN et al., 1984). H_2O_2 gilt generell als Membran-toxisch und wird daher in der Zelle von Katalasen schnell zerstört. Während allerdings die Peroxisomen als Katalase-beherbergendes Organell betrachtet werden (HUANG et al., 1983), sprechen die hier dargestellten cytochemischen Untersuchungen an Berberis-Suspensionszellen für das Vorliegen einer zusätzlichen cytoplasmatischen Katalase, welche sich durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber Aminotriazol auszeichnet. Auch im Mais konnte ein cytoplasmatisches Katalase-Isoenzym nachgewiesen werden (SCANDALIOS, 1980). Für spezifische pflanzliche Biosyntheseleistungen spielt H_2O_2 allerdings eine unverzichtbare Rolle, allen voran bei der Ausbildung der Ligninpolymere (STICH und EBERMANN, 1984). Auch Schritte in der Alkaloid-Biosynthese, wie z.B. die zahlreichen Phenoloxidationen (BARTON, 1957) benötigen H_2O_2 als Co-substrat. Die von BARTON und COHEN (1957) formulierte oxidative Phenolkopplung des Retikulin-(R)-Enantiomeren zum Morphinandienon Salutaridin soll beispielsweise nur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (HODGES und RAPOPORT, 1982) erfolgen. Demnach könnte das in der Morphinan-Biosynthese benötigte H_2O_2 aus enzymatischen Reaktionen (BBE, STOX) der Protoberberin-Biosynthese stammen. Damit könnte die Morphinan-Biosynthese in Papaver-Arten bereits am Abzweigungspunkt von der Protoberberin-Biosynthese über einen Katalase-abhängigen H_2O_2 -Pool reguliert werden (DORNREITER, 1985). Eine so enge Verzahnung der verschiedenen, gleichzeitig realisierten pflanzlichen Alkaloid-Biosynthesewege erleichtert uns die Einsicht in die Gründe ihres Vorkommens keineswegs. Ihr Auftreten in pflanzlichen Zellkulturen gar zeigt, daß die Pflanzenzelle Alkaloide bildet, unter Verhältnissen, in welchen diese Substanzen unter keinem der angedeuteten Gesichtspunkte eine Rolle

spielen dürften. Die rein ökochemische Funktion der Alkaloide wird durch die jüngsten Berichte zur Verbreitung des Morphins im Tierreich in Frage gestellt. Morphin, bislang nur wenigen Papaver-Arten zugeschrieben, konnte zweifelnsfrei im Gehirn von Rindern nachgewiesen werden (KOSTERLITZ, 1985; GOLDSTEIN et al., 1985). Sollte sich seine endogene Herkunft nachweisen lassen, könnte uns das vielleicht weiterhelfen, die Funktion der Alkaloide zu verstehen. Bislang läßt sich also auf die Frage nach dem Warum bezüglich der Alkaloide noch nicht in allen Fällen eine befriedigende Erklärung finden.

Der naturwissenschaftlichen Methode leichter zugänglich ist die Frage nach dem Wie. Die Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen, welche die Protoberberine für den pflanzlichen Organismus zu tauglichen Abwehrverbindungen machen, könnten der Zelle selbst freilich auch zum Verhängnis werden. Wie die meisten differenzierten Pflanzenzellen, so haben auch die Zellen pflanzlicher Zellkulturen dieses Problem durch Kompartimentierung der Protoberberine in der Vakuole gelöst (MATILE, 1978). Wie fast alle bisher untersuchten Vakuolen, zeigt auch die Berberis-Vakuole einen sauren pH-Wert, was sie als Ort der Protoberberin-Biosynthese nicht in Frage kommen läßt. Spezifische Orte, an denen sich die Alkaloid-Biosynthese lokalisieren läßt, konnten bisher weder für Alkaloide noch für andere Sekundärstoffgruppen beobachtet werden, sollen aber später eingehend - auf die Protoberberine bezogen - diskutiert werden.

Die Biosynthese des Protoberberins Berberin ist in Abbildung 57 noch einmal im Überblick dargestellt. Interessanterweise zeigen alle vier Enzyme, welche die Biosynthese der biogenetischen Schlüsselverbindung Retikulin katalysieren, maximale Aktivitäten in einem pH-Intervall von 7.5 - 7.8, also in etwa unter den Bedingungen, wie sie im Cytoplasma der pflanzlichen Zelle vorliegen. Die vier an der nachfolgenden Umsetzung zum Berberin beteiligten Enzyme hingegen weisen einheitlich bei weniger als einem Zehntel dieser Protonenkonzentrationen (pH 8.9) das pH-Optimum ihrer kataly-

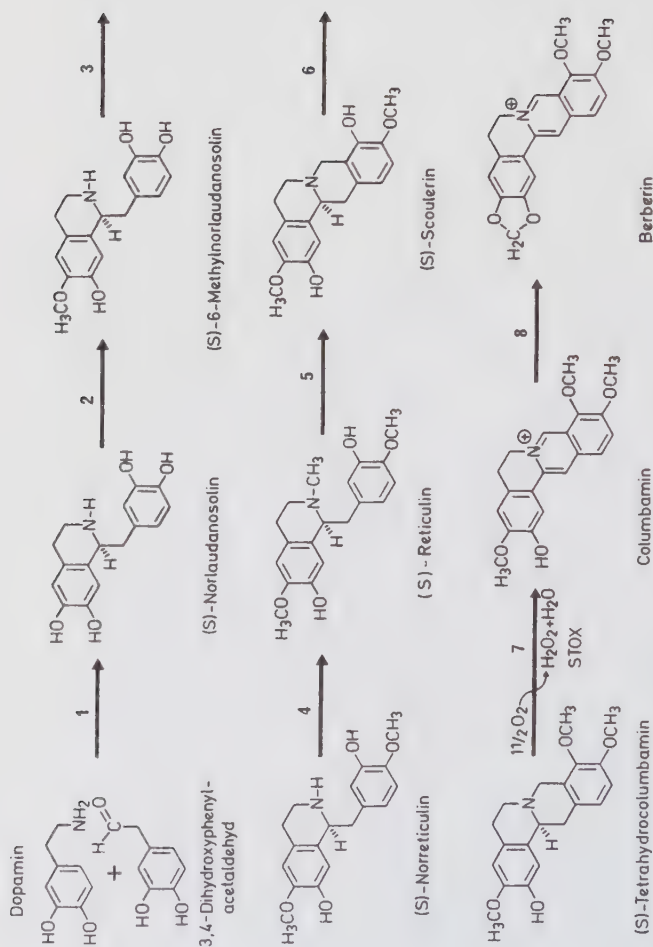


Abbildung 57

Biosynthese des Protoberberinalkaloids Berberin.

Alle Enzyme dieser acht Reaktionsschritte konnten aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert, gereinigt und charakterisiert werden. (1) Norlaudanosolin-Synthase, (2) S-Adenosyl-(L)-methionin: (R,S)-Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase, (3) S-Adenosyl-(L)-methionin: 6-O-Norlaudanosolin-4'-O-Methyltransferase, (4) Norretikulin-N-Methyltransferase, (5) Berberinbrückenenzym (BBE), (6) S-Adenosyl-(L)-methionin: (S)-Scoulerin-9-O-Methyltransferase, (7) (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (STOX), (8) Berberinsynthase.

lytischen Aktivität auf, was mit Sicherheit keine zufällige Laune der Natur ist (ZENK et al., 1985). So wäre beispielsweise die Enzym-Aktivität des Berberin-Brücken-Enzyms (BBE) und der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) unter vakuolären Bedingungen (pH 5.5) gleich Null. Auch hinsichtlich der katalysierten Reaktion zeigen diese beiden Enzyme Ähnlichkeiten. Beide Enzym-Aktivitäten zeigen absolute Stereospezifität für die (S)-Konfiguration, beide benötigen Sauerstoff als Cosubstrat, welcher jeweils zu Wasserstoffperoxid katalytisch reduziert wird. Eine suboptimale O₂-Versorgung von Protoberberinalkaloid-produzierenden Zellen sollte sich demnach möglicherweise direkt auf die Biosyntheseleistung der Zellen auswirken. Bestätigen konnte diese Erwartung eine Arbeitsgruppe in Tübingen (BREULING et al., 1985). Unter erhöhtem Sauerstoff-Partialdruck konnten sie bei einer 20 l Fermentation von Berberis wilsoniae Alkaloidgehalte von über 3 g pro Liter Medium erzielen, was deutlich jenseits der bis dahin maximal erzielten Protoberberin-gehalte einer Berberis-Kultur von 1.7 g pro Liter lag (HINZ und ZENK, 1981). Der in der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase Reaktion stöchiometrisch als Elektronenakzeptor benötigte Sauerstoff, welcher in Gegenwart geeigneter Substrate von STOX mit zwei Elektronen zu Wasserstoffperoxid reduziert wird, charakterisiert die beteiligte Enzym-Aktivität eindeutig als eine Oxidase (WALSH, 1979). Für viele Enzyme dieser Klasse ist die essentielle Beteiligung eines Metallions in seinen verschiedenen Oxidationszuständen am katalytischen Zyklus gezeigt worden. Versuche, durch eine Komplexierung des Metalls mit EDTA oder 1,10-Phenanthrolin die STOX-Aktivität zu vermindern, waren nicht erfolgreich. Da sich das Enzym auch gegenüber CN⁻ unempfindlich zeigte, sich auch keine erhöhte Enzym-Aktivität nach Vorinkubation mit verschiedenen Metallen beobachten ließ, scheint für die enzymatische Oxidation kein Metallion benötigt zu werden.

Die Verringerung der enzymatischen Oxidationsrate in Gegenwart bestimmter Metallionen ist recht ausgeprägt. Während

zweiwertige Metalle im Mittel eine ausgeprägtere Hemmung von STOX bewirken als einwertige Kationen, kann die enzymatische Katalyse mit Quecksilber und Kadmiumionen völlig zum Erliegen gebracht werden. Hg^{2+} ist dabei das potenteste inhibitorische Kation, was zeigt, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase über mindestens eine für die katalytische Aktivität essentielle Sulfhydrylgruppe verfügt. Da in Gegenwart SH-modifizierender Agenzien, wie Jodacetamid, Jodosobenzoessäure, 5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoessäure), p-Hydroxymercuribenzoessäure oder N-Ethylmaleinimid allerdings keine Enzymhemmung beobachtet wurde, muß die Thiofunktion recht geschützt und möglicherweise schlecht zugänglich sein. Auch Aminogruppen sind für die STOX-Katalyse essentiell. Eine Modifizierung von Arginin- oder Lysinresten mit 2,4-Pentandion inaktiviert das Enzym quantitativ. Daß die kovalente Kopplung von aktivem STOX an CNBr-aktivierte Sepharose nicht gelang, ist sicher auf die Blockierung essentieller Aminogruppen zurückzuführen. Für regulationsbiologische und molekularbiologische Untersuchungen wäre es recht hilfreich, könnte mittels STOX-spezifischer Hemmstoffe in vivo die Protoberberin-Biosynthese unterbrochen werden. Damit könnten mögliche regulatorische Wechselwirkungen der quaternären Endprodukte des Protoberberin-Biosyntheseweges auf die vorangehenden Biosynthese-Enzyme untersucht werden. Eine eventuelle Überproduktion von STOX wäre unter molekularbiologischen wie auch biotechnologischen Gesichtspunkten hochinteressant. Der zu unspezifische Wirkungsmechanismus macht 2,4-Pentandion in dieser Hinsicht allerdings ungeeignet. Auch die hohe Hg^{2+} -Empfindlichkeit von STOX läßt sich in vivo nicht ausnützen, da bereits mit 10 μmol pro Liter HgCl_2 , also weit unterhalb der zur STOX-Hemmung nötigen Quecksilber-Konzentration, das Schwermetall-komplexierende pflanzliche Phytochelatinsystem induziert wird (GRILL et al., 1985).

Die schwache, gelbgrüne Fluoreszenz der gereinigten (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase bei Anregung mit ultravioletttem Licht, wie auch ihr charakteristisches Fluores-

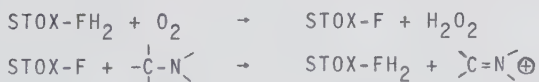
zenz-Emissionsspektrum mit einem Maximum bei ca. 530 nm, sind starke Hinweise auf den Flavoprotein-Charakter des Enzyms. Alle vergeblichen Versuche, den Cofaktor zur Aufklärung seiner Struktur vom Apoprotein abzuspalten, deuten darauf hin, daß er kovalent mit dem Protein verbunden ist. Wenngleich der erfolgreiche Einbau ^{14}C -markierten Riboflavins eindeutig STOX als Flavoenzym-Oxidase bestätigte, zeigte das UV-Absorptionsspektrum des homogenen Enzyms keineswegs den zu erwartenden spektralen Verlauf. Das für Flavoenzyme im oxidierten Zustand typische zweigipflige Spektrum konnte nur in Gegenwart von Kaliumferricyanid beobachtet werden. Überraschenderweise war der oxidierte Zustand des Flavins keineswegs stabil. So verschwand mit Abtrennung des Oxidationsmittels auch die für oxidierte Flavine typische spektrale Absorption. Nicht autoxidable Flavoproteine sind bislang nur als Komponenten von Elektronentransfer-Systemen beschrieben worden. Stabil ist ein reduziertes Flavoenzym nur dann, wenn durch die Konformation seiner Flavin-bindenden Domäne das reduzierte Flavin stark bevorzugt gebunden wird. Nur in einer äußerst starken Wechselwirkung mit dem Apoenzym ist eine so ausgeprägte Veränderung der Resonanzstabilisierung des Isoalloxazinsystems denkbar. Aus dieser Sehweise heraus erscheint es einleuchtend, daß das Flavin als prostetische Gruppe kovalent mit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase verbunden ist. Der angesprochene mögliche essentielle Charakter einer kryptischen Sulfhydrylgruppe paßt gut in die Vorstellung eines reduzierten Flavins, welches vor Autoxidation geschützt in einer schlecht zugänglichen Proteintasche gebunden ist. Die Empfindlichkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase gegenüber höheren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen und seine Unempfindlichkeit gegenüber NaBH_4 zeigen, daß das Enzym eher durch oxidierende als durch reduzierende Agenzien in seiner Aktivität beeinträchtigt werden kann. Dies kann auch als Evidenz für einen stabileren, reduzierten Grundzustand angesehen werden. Daß allerdings in vivo eine STOX-Aktivitätsminderung durch H_2O_2 eine Rolle spielen könn-

te, erscheint unwahrscheinlich, da eine Akkumulation von Wasserstoffperoxid wegen der im Cytoplasma vorliegenden Katalase-Aktivität nicht möglich ist. Die genaue Identifizierung des Flavins und seiner Bindungsstelle am Protein ist noch offen. Als Strategie wäre die proteolytische Darstellung von STOX-Peptiden denkbar, aus welcher sich z.B. nach Hochdruckflüssigkeits-chromatographischer Auftrennung das flavinylierte Peptid bei geeigneter Detektion isolieren lassen sollte. Die Flavinnatur könnte dann aus spektroskopischen Daten abgeleitet werden (SINGER, EDMONDSON, 1980), der kovalent gebundene Aminosäurerest aus Sequenzanalysen. Da von den bislang 23 bekannten Flavoproteinen mit kovalent gebundenem Flavin (1982) nur zwei mikrobielle Dehydrogenasen FMN besitzen, ist es äußerst wahrscheinlich, daß reduziertes FAD (FADH_2) die prostetische Gruppe der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ist. Als Aminosäurereste kämen dann Histidin, Cystein oder Tyrosin in Frage (DECKER, 1982).

Viele Flavoenzyme zeigen beim Durchlaufen ihres Redoxzyklus eine charakteristische Fluoreszenz. Durch Wechselwirkung mit benachbarten Tyrosin- und Tryptophanresten scheint sie in manchen Fällen quenchbar zu sein. Die orangefarbene Fluoreszenz, welche während der STOX-Katalyse bei Einstrahlung von ultravioletem Licht zu beobachten ist, ist mit dem katalytischen Zyklus unmittelbar verbunden und scheint durch die Wechselwirkung des Substrats/Produkts mit dem Enzym wesentlich bestimmt zu sein. Inwieweit dabei Charge-Transfer-Wechselwirkungen eine Rolle spielen, wie sie beispielsweise Pyridinnukleotid-abhängige Flavoenzyme zeigen, ist nicht klar. Eine Interaktion des Isochinolin- oder Protoberberin-Systems mit dem Isoalloxazingerüst über ihre aromatischen π -Elektronen erscheint aber durchaus möglich. Eine andere Möglichkeit, die Fluoreszenz zu erklären, könnten die bei der Flavin-Katalyse häufig zu beobachtenden stabilen Semichinonformen des Flavins sein, welche bei alkalischem pH-Wert rot gefärbt sind. Zur Klärung dieser Frage, vor allem aber im Hinblick auf die sicher höchst interessante Flavin-Protein-Wechselwirkung, sollten daher

Resonanz-Raman-spektroskopische Messungen vorgenommen werden, welche bei vergleichbaren Fragestellungen anderer Oxidasen wertvolle Informationen geliefert haben (NISHIMA et al., 1982).

Durch die Wechselwirkung der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase mit ihren noch zu erörternden Substraten aus der Gruppe der 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine werden den Substraten unter Ausbildung einer Iminiumstruktur zwei Elektronen entzogen und mit ihnen O_2 zu H_2O_2 reduziert. Das Problem im Falle der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase liegt nun darin, daß der primäre Akzeptor dieser Reduktions-äquivalente das STOX-Flavoenzym ist, dessen wahrscheinlich reduzierter Zustand jedoch bevorzugt ist. Während STOX für sich nicht autoxidabel ist, könnte es sehr wohl in Gegenwart von geeigneten Substraten oxidierbar sein, wobei die Beteiligung einer reduzierbaren Disulfidgruppe nicht ausgeschlossen werden kann. So könnte, wie in dem nachstehenden Schema dargestellt, die oxidative Halbreaktion der reduktiven vorangehen. F/FH_2 steht dabei für die oxidierte und reduzierte Form der Flavingruppe $-C=N$ und $C=N^+$ für das reduzierte Substrat bzw. für das oxidierte Produkt.



Die STOX-katalysierte enzymatische Oxidation führt zur Ausbildung einer Iminium-Struktur, also dem 1,2-Dehydrobenzylisochinolin mit 1-Benzylisochinolin als Substrat und dem 7,14-Dehydroprotoberberin im Falle der Tetrahydroprotoberberine. Während erstere Verbindung relativ stabil ist, kann letztere auch spontan in Gegenwart von Sauerstoff zum entsprechenden Protoberberin oxidieren (MEISE, 1971). Dieser Unterschied erklärt die bezüglich des Sauerstoffverbrauchs unterschiedlichen Stöchiometrien der enzymatischen 1-Benzylisochinolin- und Tetrahydroprotoberberin-Oxidation.

Betrachtet man die natürlich vorkommenden Tetrahydroprotoberberine unter dem Gesichtspunkt ihrer Eignung als Sub-

strat für STOX, so sollten sich nur solche Verbindungen umsetzen lassen, welche die Ausbildung einer Iminium-Struktur ermöglichen können. Tatsächlich konnte STOX N-Methylcandidin und Escholidin nicht umsetzen. Beide Verbindungen besitzen in der reduzierten Form bereits ein quaternäres Stickstoffatom. Für die enzymatische Oxidierbarkeit spielt das aromatische Substitutionsmuster der Tetrahydroprotoberberine keine wesentliche Rolle. Die Modifizierung des C-Ringes mit einer Methylgruppe am C-Atom 13 allerdings verwandelt gut oxidierbare Substrate wie Tetrahydropalmatin, Tetrahydrojatrorrhizin oder Stylopin in Verbindungen, welche von STOX nicht mehr als Substrate akzeptiert werden. Tendenziell ähnlich wirkt sich die Einführung eines Substituenten am C-1 aus. Hinweise auf die Ursache dieses Effekts lassen sich in den Konformationsänderungen des Tetrahydroprotoberberin-Moleküls durch die zusätzlichen Substituenten finden. Während die am C-1 und C-13 unsubstituierten Verbindungen in der trans-Chinolizidin-Konformation mit dem B- und C-Ring als Halbsessel vorliegen, ist nach Einführung eines C-1-Substituenten auch die cis-Konformation möglich. Die C-13-Methylgruppe verändert durch ihre Wechselwirkung mit dem C-1 ebenfalls die Konformation signifikant gegenüber dem unsubstituierten Tetrahydroprotoberberin (IWASA et al., 1981; RINGDAHL et al., 1981). Die Einführung von Substituenten in das Tetrahydroprotoberberin-Gerüst am Stickstoff, am C-1 und am C-13 des C-Rings ist also eine Möglichkeit, Tetrahydroprotoberberine vor der enzymatischen Oxidation im C-Ring durch die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zu schützen.

Vom Reaktionsmechanismus her erscheint es plausibel, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase die Oxidation von 1-Benzylisochinolin-Alkaloiden wie auch von Tetrahydroprotoberberinen katalysieren kann. Beispiellos ist dies allerdings im Hinblick darauf, daß ein und dasselbe Enzym an der Biosynthese zweier verschiedener Isochinolin-Alkaloide beteiligt ist. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysiert - so betrachtet - einen frühen Schritt in der

Morphinan-Biosynthese, den oxidativen ersten Schritt bei der Konfigurationsumkehr am C-1 des 1-Benzylisochinolin-skeletts, wie auch den terminalen Schritt der Protoberberin-Biosynthese (AMANN et al., 1984). Ob sie darüber hinaus noch an der Biosynthese anderer Benzylisochinoline beteiligt ist, wird sich bei der Aufklärung der einzelnen Biosynthesewege zeigen. Bereits bei den einfachen Isochinolinen sind oxidierte Formen isoliert worden. In vitro konnten einige davon mit Monophenol-Oxidasen aus den korrespondierenden 1-Carboxylsäuren erhalten werden (COUTTS et al., 1979). Die physiologische Signifikanz dieser Beobachtung ist unklar. Auch in komplexeren Dimeren, wie z.B. Ancistrocladidin, sind oxidierte Isochinoline beschrieben worden (RUANGRUNGSI et al., 1985). Leichter zugänglich wäre die Frage nach der Beteiligung von STOX an der Papaverinbildung. Die B-Ring-Aromatisierung des 3,4-Dehydroisochinolins sollte sich in einem optischen Test leicht bestimmen lassen. Auch in der Biosynthese der dimeren Bisbenzylisochinoline könnte STOX einen Schritt katalysieren. So wurden häufig Moleküle dieser Verbindungsklasse isoliert, deren eine Hälfte ein oxidiertes 1-Benzylisochinolin ist (GUINAUDEAU et al., 1984). Auf welcher Stufe, vor oder nach der Dimerisierung, die enzymatische Oxidation erfolgt, muß noch geklärt werden. Auch die Biosynthese der Pavine könnte über die 1,2-Dehydroform des Benzylisochinolin-skeletts verlaufen (CORDELL, 1981). Wie es Protoberberine und die entsprechenden reduzierten Tetrahydro-Verbindungen gibt, existieren bei den biogenetisch verwandten Benzo-phenantridin-Alkaloiden ebenfalls reduzierte Pendants. Ihre Oxidierbarkeit durch die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ist noch unklar. Als Testverfahren zur Messung einer evtl. STOX-katalysierten Oxidation in allen angesprochenen Isochinolingruppen könnten optische Tests ausgearbeitet werden, da sich die spektrale Absorption der oxidierten Produkte jeweils charakteristisch von der des reduzierten Substrats unterscheidet.

Die STOX-katalysierte enzymatische Oxidation ist mit der Übertragung von Elektronen auf das kovalent gebundene Flavon verbunden. In Gegenwart geeigneter Akzeptorverbindungen, wie dem Pentahydroxyflavon Morin, läßt sich dieser Elektronenfluß verhindern, was zu einer Inhibition der enzymatischen Katalyse von STOX führt. Die hohe Empfindlichkeit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase gegenüber Morin konnte zur Blockierung der Protoberberin-Biosynthese in vivo nicht ausgenutzt werden, was möglicherweise in der Impermeabilität des Plasmalemmas gegenüber so polaren Verbindungen begründet ist.

Die mit Protoberberinen gemessene Endprodukthemmung von STOX könnte auch innerhalb der Zelle von Bedeutung sein. Die mittlere Protoberberin-Konzentration einer Berberis-Zelle beträgt etwa 1 mmol pro Liter, in Hochleistungsstämmen wurden die 5-fachen Werte gemessen. Wenngleich die Vakuole der Ort ist, in welchem die Protoberberine in der Zelle abgelagert werden, so ist noch unklar, ob nicht in den STOX-haltigen Vesikeln - welche noch zu besprechen sind - ähnliche Konzentrationen erreicht werden können. Die Protoberberin-Synthese könnte dadurch unterbrochen werden, wenngleich eine solche Regulation für sich genommen die Einstellung einer niedrigen Protoberberin-Konzentration nicht erlauben würde. Auch in der Morphin-Biosynthese könnte die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase maßgeblich die Ökonomie der Biosynthesekette bestimmen. Könnten aus physiologischen Gründen die Enzyme, welche das (R)-konfigurierte Substrat weiter umsetzen, nicht aktiv sein, würde durch die erhöhte Pool-Konzentration des (R)-Enantiomeren die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase gehemmt. Intermediate würden dadurch nicht sinnlos angehäuft.

Die ausgearbeiteten Enzymtests, radioimmunologische Nachweise und die cytologisch/cytochemischen Untersuchungen an Berberis-Zellen bestätigten immer wieder die absolute Spezifität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxydasen für (S)-konfigurierte Substrate, welche daher im "(S)"-Präfix

des Enzymnamens dokumentiert wurde. Wie der Vergleich aller acht an der Berberin-Biosynthese beteiligten Enzyme zeigt, werden keineswegs alle Schritte stereospezifisch katalysiert (ZENK et al., 1985). Die Stereospezifität des ersten Enzyms der Norlaudanolin-Synthase (die Numerierung bezieht sich auf die Zahlen in Abbildung 57) erscheint absolut notwendig, da die beiden Reaktionspartner in vitro bereits spontan unter Ausbildung eines racemischen Produkts reagieren. Für die Biosynthese der Schlüsselverbindung (S)-Retikulin wäre es - da nur das (S)-konfigurierte Substrat zur Verfügung steht - nicht notwendig, daß die drei nachfolgenden Methylierungen stereospezifisch erfolgen. Hinsichtlich der Biosynthese des (R)-Retikulins ist es allerdings notwendig, daß die N-Methylierung (Enzym 4) stereounspezifisch verläuft. Nur so könnte das von STOX und einer noch unbekannten Reduktase gebildete (R)-Norretikulin über (R)-Retikulin in die Morphinan-Biosynthese eintreten. Die Anwesenheit beider Substrat-Enantiomeren auf der Norretikulin-/Retikulin-Ebene erfordert es, daß die nachgeschalteten Enzyme zwischen den beiden Enantiomeren unterscheiden können, was für die Enzyme der Protoberberin-Biosynthese auch gefunden wurde. Das Berberinbrücken-Enzym katalysiert stereospezifisch die Bildung von (S)-Scoulerin, welches - wie sein methyliertes Produkt (S)-Tetrahydrocolumbamin - stereospezifisch von STOX oxidiert werden kann. Auch im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von STOX an der Morphin-Biosynthese wäre die enzymatische Stereospezifität absolut notwendig. Das aus den 1,2-Dehydroformen von Retikulin oder Norretikulin von einer postulierten stereospezifischen Reduktase möglicherweise gebildete (R)-Enantiomer dürfte keinesfalls von STOX als Substrat akzeptiert werden. Nur die absolute (S)-Stereospezifität von STOX könnte einen Reduktionäquivalente-verbrauchenden sinnlosen Kurzschluß in der Biosynthesekette verhindern. Die enzymatische Oxidation des (S)-Tetrahydroprotoberberin-Gerüsts erfolgt strikt stereospezifisch bezüglich des chiralen C-14. Der C-Ring weist daneben noch zwei weitere prochirale Kohlenstoffe auf,

C-13 und das Berberinbrücken-Kohlenstoffatom C-8. Fütterungs-experimente mit optisch inaktiven stereospezifisch am C-13-Atom Tritium-markiertem pro-(R)- und pro-(S)-Scoulerin zeigten am Beispiel von Canadin und Stylopin, daß die Oxidation zum Berberin bzw. Coptisin bezüglich des prochiralen C-13 stereounspezifisch verläuft (BATTERSBY et al., 1975). Keine Vorstellung gibt es noch über die Stereochemie der C-8-Oxidation. Die Aufklärung dieses Schrittes ist vor allem im Zusammenhang mit dem Schluß der Berberinbrücke von grundlegendem mechanistischem Interesse. NMR-Studien mit Scoulerin, welches aus chiral-markiertem (Methyl-R) und (Methyl-S)-(N-Methyl- $^2\text{H}^3\text{H}$)-Retikulin enzymatisch synthetisiert werden könnte (FLOSS und TSAI, 1979), sollten diese Frage beantworten können.

Die Enzym-Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase in zellfreien Präparationen liegt in der Regel 2- bis 3-fach höher als die des Berberinbrücken-Enzyms. Da (S)-Norretikulin für STOX ein hervorragendes Substrat darstellt und auch (S)-Retikulin - wenngleich deutlich schlechter - oxidiert wird, stellt sich die Frage, wie es die pflanzliche Zelle überhaupt fertigbringt, dem Berberinbrücken-Enzym noch ausreichende Substratmengen zur Verfügung zu stellen. Die Lösung dieses Problems wurde offensichtlich im Laufe der Evolution durch die Kompartimentierung biosynthetischer Teilschritte gelöst. Um die Lebensvorgänge in einem Organismus verstehen zu lernen, ist es hilfreich, sich immer wieder bewußt zu machen, daß die Betrachtung eines Organismus unter dem Gesichtspunkt der Wechselwirkung von Biomolekülen nur eine von zahlreichen möglichen Abstraktionen darstellt. Das Auffinden der geeignetsten Abstraktionsebene ist eine wesentliche Erkenntnis. Die Betrachtung einer Zelle unter dem Gesichtspunkt des Zusammenspiels Membran-umschlossener Räume ist eine für die Diskussion der Alkaloid-Biosynthese hilfreiche und nützliche Vorstellung.

Wenngleich die Kompartimentierung von Enzymen der Alkaloid-Biosynthesewege in zahlreichen Monographien diskutiert wird

(z.B. MOTHES et al., 1975), ist bis heute noch kein Beispiel aus dem Pflanzenreich beschrieben worden. Die Isolation eines Vesikels, welche die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase umschließt, ist der erste Hinweis auf die Richtigkeit dieser Vorstellung. Möglich war die Reinigung dieses zellulären Kompartiments erst dadurch geworden, daß über die klassische Dichtegradienten-Zentrifugations-Technik hinaus Möglichkeiten gefunden wurden, intakte Vesikel auch nach anderen physikalischen Parametern als der Schwebedichte aufzutrennen. Trennverfahren, basierend auf dem isoelektrischen Punkt und der Größe der Vesikel konnten erfolgreich eingesetzt werden. Der elektronenmikroskopische Vergleich der sehr einheitlichen STOX-enhaltenden Vesikelpräparationen mit den Berberis-Zellen zeigte, daß die glatten 0.1 bis 1 µm großen, oft trau- big aggregierten Vesikel häufig in der Protoberberine-syn- thetisierenden Pflanzenzelle anzutreffen sind.

An wenigen Beispielen war es bislang immerhin gelungen, vesikuläre Strukturen mit verschiedenen Sekundärstoffinhalten zu beschreiben. TSUKADA und TABATA fanden 1984 in einer Pigment-produzierenden Zellkultur von Lithospermum erythrorhi- zon ca. 0.2 µm große Naphthochinon-haltige Vesikel, welche durch Fusion mit Plasmalemma ihren Inhalt nach außenhin ab- geben können. Wie weit die in Zellen von Euphorbia-Zellkul- turen beobachteten Terpenoide und Steroide enthaltenden intrazellulären Partikel von einer Einheitsmembran umschlos- sen sind, geht aus der Literatur nicht hervor(OHYAMA et al., 1984). Während Anthocyane üblicherweise in der Zentralvakuole akkumuliert werden, konnten in Ipomoea batatas zusätzli- che sphärische Anthocyan-haltige Vesikel im Cytoplasma loka- lisiert werden. Ihre Bildung scheint lichtabhängig zu er- folgen, ihr Durchmesser kann bis auf 15 µm anschwellen, doch beschränkte sich die Untersuchung lediglich auf die Auswer- tung lichtmikroskopischer Beobachtungen (NOZUE und YASUDA, 1985). Elektronenmikroskopische Vergleiche von Vesikelprä- parationen aus Capsicum-Arten mit differenzierten Zellen, welche Capsaicinoide enthalten, zeigen, daß diese Inhalts- stoffe ebenfalls in Vesikeln kompartimentiert vorliegen

(SUZUKI und IWAI, 1984). Gut untersucht ist die subzelluläre Lokalisation der Morphin- und Benzophenanthridin-Alkaloide im Latex von Papaver (KUTCHAN et al., 1984). Die über Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Alkaloidhaltigen Vesikel zeigten allerdings recht unterschiedliche Formen. In keinem der oben angesprochenen Beispiele ist jedoch über die Lokalisation der beteiligten Sekundärstoff-Enzyme (soweit sie überhaupt bekannt sind) irgend etwas bekannt.

Die aus Berberis-Zellkulturen isolierten STOX-haltigen Vesikel enthielten darüber hinaus genau diejenigen Protoberberin-Alkaloide, die sich aus diesen Zellkulturen isolieren lassen. Da die Hauptalkaloidmenge in der Vakuole vorliegt, entsprechen sich also die Alkaloidmuster der Vakuole und Vesikel, was auf eine enge Verflechtung beider Kompartimente hindeutet. Versuche, die oxidierten Protoberberine aus den Vesikeln auszuwaschen, waren erfolglos. Man muß daher annehmen, daß die quaternären Verbindungen das vesikuläre Kompartiment nicht mehr verlassen können. Die Untersuchungen von RÜFFER (1984) zur Alkaloidaufnahme in Vakuolen von Thalictrum glaucum bestätigten die Membran-Impermeabilität am Beispiel des Berberins.

Neben den Protoberberin-Alkaloiden konnten in den gereinigten Vesikeln etwa 20 Proteine gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Eindeutig identifizierbar war die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase. Immunelektrophoretische Vergleiche des Vesikelinhalts mit dem Cytoplasma zeigten, daß STOX ausschließlich mit den Vesikeln assoziiert ist, wobei sich keine Hinweise auf eine Membranständigkeit von STOX ergaben. Zusammen mit der immunoelektronenmikroskopischen Untersuchung, bei welcher sich an der Vesikelaußenseite kein STOX identifizieren ließ, ergibt sich für STOX das Bild eines im Lumen des Vesikels gelösten Enzyms. Das Berberinbrücken-Enzym, welches das 1-Benzylisochinolinskelett des (S)-Retikulins zum (S)-Tetrahydroprotoberberin verbrückt, konnte ebenfalls in den Ve-

sikeln nachgewiesen werden (STEFFENS et al., 1985).

E. GALNEDER schließlich konnte in unserem Arbeitskreis unlängst die Berberin-Synthase katalysierte enzymatische Umsetzung von Columbamin zu Berberin in den Vesikeln zeigen (pers. Mitteilung). Eine Vesikel-eigene Katalase dagegen wurde nicht gefunden. Da sowohl STOX als auch das Berberinbrücken-Enzym in ihrem katalytischen Zyklus Wasserstoffperoxid freisetzen, erscheinen die Vesikel nach außen hin damit als Zellstrukturen, welche H_2O_2 produzieren. Die Beobachtung, daß oxidierte Protoberberine die Vesikel nicht verlassen können, würde notwendigerweise die Schlußfolgerung bedingen, daß alle Enzyme, welche oxidierte Protoberberine umsetzen, ebenfalls vesikulär kompartimentiert sind. Dies beträfe die Methyltransferase, welche Columbamin zu Palmatin umsetzt, sowie das Enzym, welches die Methylendioxybrücke des Berberins unter Ausbildung von Jatrorrhizin öffnen kann (BEECHER und KELLEHER, 1983; RÜFFER et al., 1983). Alle bisher identifizierten vesikulären Enzyme zeigen ein pH-Optimum ihrer katalytischen Aktivität von pH 8.9. Ob dies dem in vivo vorliegenden Säuregrad im Inneren dieses Kompartiments entspricht, ist noch unklar. Ein alkalischer pH-Wert könnte möglicherweise nur über einen aktiven H^+ -Export unter Energieverbrauch aufrecht erhalten werden.

Im Gegensatz zu ihren oxidierten Pendants können die reduzierten Tetrahydroprotoberberine und 1-Benzylisochinoline Vesikelmembranen passieren. Ob dies nur ein passiver Transport unter Abbau eines Konzentrationsgradienten, oder ein spezifischer vektorieller aktiver Transport ist, läßt sich experimentell wegen der geringen Vesikelgröße nur schlecht bestimmen. Daß der Eintritt von reduzierten Substraten in den Vesikel ein aktiver Vorgang ist, erscheint nicht ausgeschlossen, da solche hochspezifischen Alkaloidtransport-Systeme am Tonoplasten nachgewiesen werden konnten (DEUS-NEUMANN und Zenk, 1984). Die Inkubation von Vesikeln mit (S)-Retikulin führte zur Bildung von Dehydroscoulerin. Da kein 1,2-Dehydroretikulin nachweisbar war, welches aus

mechanistischen Überlegungen höchstwahrscheinlich kein Substrat des Berberinbrücken-Enzyms ist, mußte demnach (S)-Retikulin quantitativ vom Berberinbrücken-Enzym zu (S)-Scoulerin umgewandelt und erst dann zur Dehydroform oxidiert worden sein. Das Berberinbrücken-Enzym muß demnach in jedem Fall das Substrat umsetzen können, noch bevor es von STOX oxidiert werden kann. Interessanterweise erfolgt die Methylierung des (S)-Scoulerins zum (S)-Tetrahydrocolumbamin außerhalb des Vesikels im Cytoplasma. Da aus pflanzlichem Material noch nie Dehydroscoulerin extrahiert werden konnte, muß die Ausschleusung des Scoulerins aus dem Vesikel ein obligatorischer Vorgang sein. In Gegenwart der cytoplasmatischen Scoulerin-9-O-Methyltransferase und SAM wird Tetrahydrocolumbamin gebildet, welches dann intravesikulär oxidiert und möglicherweise methyliert werden kann. Eine ganz analoge Kooperation einer cytoplasmatischen Methyltransferase mit vesikulär kompartimentierten Biosynthese-Sequenzen findet man in den chromaffinen Zellen der Nebenniere. Während die Dopamin- β -Hydroxylase vesikulär Noradrenalin bildet, erfolgt im Cytosol die N-Methylierung zum Adrenalin, welches anschließend in einem aktiven Transport wieder in die Catecholamin-haltigen Vesikel zurückgeschleust wird (CARMICHAEL und WINKLER, 1985; ANGELETTI et al., 1985).

Die Membran der an der Protoberberin-Biosynthese beteiligten Vesikel ist also für reduzierte 1-Benzylisochinoline bzw. Tetrahydroprotoberberine in beide Richtungen permeabel. Auf dieser Stufe werden die Alkaloide in Kooperation mit cytosolischen Enzymen umgesetzt. Durch die STOX-katalysierte intravesikuläre Oxidation der Tetrahydroprotoberberine zu geladenen Protoberberinen müssen aufgrund der Membranundurchlässigkeit für Protoberberine alle enzymatischen Reaktionen dieser Oxidationsstufe im Vesikelinneren erfolgen. Abbildung 58 illustriert diese Vorstellung. Durch Anlagerung der Vesikel aneinander bilden sich traubige Aggregate (vgl. Abbildung 38), welche zu größeren Vesikeln fusionieren können. Dabei kann es auch vorkommen,

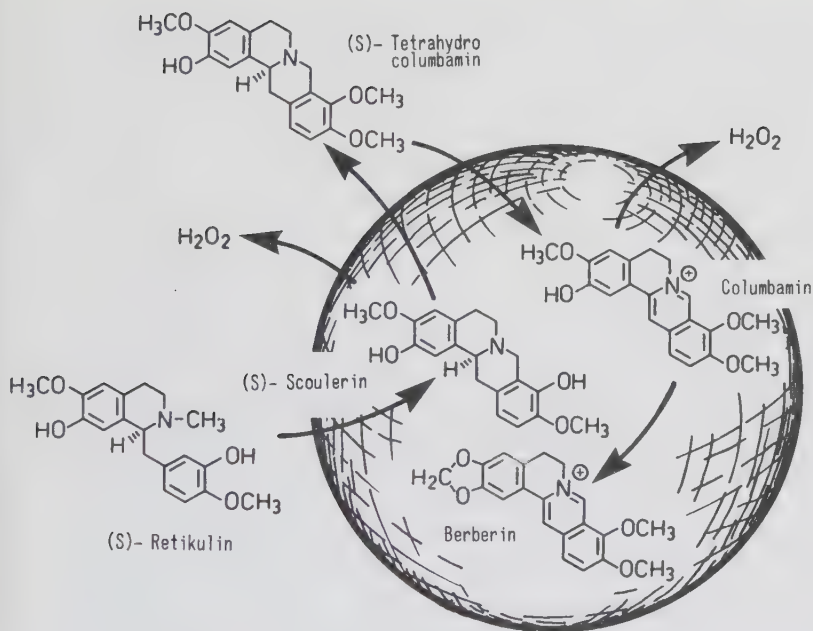


Abbildung 58

Modellvorstellung des Protoberberinalkaloide synthetisierenden Vesikels. Die Ausbildung der Berberinbrücke, die STOX-katalysierte Oxidation und die enzymatischen Umsetzungen der quaternären Protoberberine sind innerhalb des Vesikels lokalisiert. Die Membran ist impermeabel für Protoberberine, kann aber von reduzierten 1-Benzylisochinolininen und Tetrahydroprotoberberinen durchquert werden, welche Substrate für cytoplasmatische Enzyme darstellen. Der Vesikel kann als H₂O₂ generierendes System betrachtet werden.

daß ein kleiner Vesikel in das Innere eines größeren zu liegen kommt. Durch Fusion der Vesikel mit der Tonoplastenmembran schließlich gelangen die oxidierten Protoberberine in die saure Vakuole. Da der Tonoplast dadurch zumindest lokal für Tetrahydroprotoberberine und 1-Benzylisochinoline durchlässig würde, erklärt diese Vorstellung auch den Befund, daß trotz höchster STOX-Aktivität eines Gewebes auch reduzierte Alkaloide aus den Zellen extrahiert werden können. Das (S)-Retikulinmolekül, welches in den Vesikel gelangt, wird also - falls es nicht auf der Stufe des Scoulerins extravasikulär in andere Biosynthesewege geschleust wird - schließlich als Protoberberin enden. Für die Morphin-Biosynthese, zu deren Beginn die Umwandlung des 1-Benzylisochinolins (S)-Retikulin in das (R)-Enantiomere postuliert wurde, muß daher ein Berberinbrücken-Enzym freies Vesikel postuliert werden. Die Identifizierung eines solchen Kompartiments wäre leicht dadurch erreichbar, daß ein Berberinbrücken-Enzym und STOX-haltiges Vesikel (S)-Retikulin zum rot gefärbten Dehydroscoulerin umsetzt, ein Berberinbrücken-Enzym freies STOX-haltiges Vesikel (S)-Retikulin zum gelben 1,2-Dehydroretikulin oxidieren würde. Die Annahme eines zusätzlichen Morphin-Biosynthesevesikels wäre für die Enantiomeren-Umwandlung nicht nötig, falls diese auf der Stufe des Norretikulins erfolgte. Da weder die Norretikulinenantiomere noch (R)-konfiguriertes Retikulin Substrate des Berberinbrücken-Enzyms sind, könnte dadurch die Einschleusung von Benzylisochinolin in die Protoberberin-Biosynthese vermieden werden. Die in Berberis-Zellen beobachtete Vielfalt vesikulärer Zellstrukturen erfordert es, daß die Fusion dieser Vesikel untereinander oder mit dem Tonoplasten kein zufälliger Vorgang ist, sondern durch spezifische Membrankomponenten bedingt wird, wie sie beispielsweise für die verschiedenen Vesikel des Golgi-Apparates beschrieben wurden (DUNPHY und ROTHMANN, 1985). Eine Veränderung dieser noch unbekannten Erkennungsstrukturen könnte dazu führen, daß die Protoberberin-haltigen Vesikel mit anderen Zellmembranen fusionieren könnten. Die Vorstellung, daß die Protoberberin-haltigen Vesikel mit dem Plasmalemma ver-

schmelzen könnten, macht die Arbeiten von NAKAGAWA et al. (1984) recht verständlich, welcher unter ganz speziellen Bedingungen die Ausscheidung von Berberin ins extrazelluläre Medium bei Thalictrum-Kulturen beobachtet hatte.

Die Kompartimentierung von Abschnitten der Protoberberin-Biosynthese in Vesikeln ist keine Spezialität von Berberis-Zellkulturen. Nachgewiesen werden konnte sie auch in Protoberberin-synthetisierenden Kulturen aus der Familie der Ranunculaceae und Menispermaceae sowie in Blättern der Pflanzen aus der Familie der Annonaceae und Papaveraceae (vgl. Abbildung 44). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Zuordnung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels zu vesikulären Kompartimenten beschrieben (AMANN et al., 1986). Die Kompartimentierung von Sekundärstoffen in Vesikeln scheint aber ein verbreitetes pflanzliches Organisationsprinzip zu sein. Zur Verdeutlichung dieses Konzepts sollten daher die Alkaloide-synthetisierenden Vesikel als "Alkalosomen" bezeichnet werden. Ein übergeordneter Begriff, welcher alle Vesikel, welche Sekundärprodukte bilden, subsumiert, könnte dieses Prinzip für alle Naturstoffklassen zum Ausdruck bringen: "Seduktosom". Die Liste der bisher beschriebenen subzellulären "some" würde damit um einen Vertreter bereichert werden (KÜHN, 1985).

Die Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase konnte in Zellkulturen wie in differenzierten Geweben aus insgesamt sechs verschiedenen Familien nachgewiesen werden. Um auch in winzigen Mengen pflanzlichen Materials STOX nachzuweisen, wurde ein STOX-spezifisches Immunoblotting-Verfahren gearbeitet, welches - unter Vorbehalt - auch auf getrocknete Pflanzen und historisches Herbarmaterial ausgeweitet werden konnte. Während Analysen von DNA und Proteinen historischer, menschlicher Gewebereste bekannt sind (PÄÄBO, 1985; HARRISON et al., 1969), wurden in herbarisiertem Pflanzenmaterial lediglich Alkaloide und Nukleinsäuren bestimmt (WIECZOREK, 1985; ROGERS und BENDICH, 1985). Der älteste "STOX-Fund", über den hier berichtet wird, ist auf 1888 datiert. Der

blockierte N-Terminus von STOX wie auch die spezielle cytoplasmatische Anordnung des Enzyms im pflanzlichen Gewebe, könnten mit dazu beigetragen haben, daß genügend große antigene STOX-Determinanten im Trocknungsprozeß konserviert wurden.

Wie zu Eingang des Kapitels ausgeführt, lassen sich Fragen nach der Rolle der Protoberberine in der Pflanze nur spekulativ beantworten. Die Antwort, warum diese Verbindungen einen Kristallisationspunkt der Sekundärstoff-Forschung bilden, liegt neben dem prinzipiellen akademischen Interesse darin, daß Berberin pharmakologische Wirkungen zeigt (SUFFNESS und CORDELL, 1985) und biotechnologisch mit pflanzlichen Zellkulturen hergestellt werden kann (SATO und YAMADA, 1984; BREULING et al., 1985). Wenngleich Berberin seit altersher einen festen Platz in der japanischen Volksmedizin besitzt und schon seit Jahren an der Entwicklung biotechnologischer Produktionsverfahren gearbeitet wird, wurden enzymatische Studien zur Protoberberin-Bildung in Japan erst spät aufgenommen. Die in Coptis japonica-Rohextrakten beschriebene STOX-Aktivität (MURRAY 1984; YAMADA und OKADA, 1985) katalysierte, wie die zur Homogenität gereinigte (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase aus Berberis wilsoniae var. subcaulialata, die Sauerstoff-abhängige (S)-spezifische Canadin-Oxidation. Die Bildung von Wasserstoffperoxid wurde nicht beobachtet, was allerdings mit dem verwendeten Nachweissystem unter den angegebenen Bedingungen nicht möglich war. Das Molekulargewicht des Coptis-Enzyms ist mit 58 kD deutlich kleiner als das 105 kD große STOX aus Berberis. Ob es, wie das Berberis-Enzym, ebenfalls eine dimere Struktur aufweist, ist unklar. STOX liegt in Berberis-Zellen in multiplen Formen vor. Neben dem 105 kD-Enzym ließ sich in geringen Mengen noch eine weitere immunologisch kreuzreagierende 46 kD große STOX-Aktivität nachweisen. Inwieweit diese Aktivitäten aus Berberis mit der Oxidase-Aktivität aus Coptis übereinstimmt, kann nicht gesagt werden.

Neben dem biotechnologischen Potential der oxidierten Pro-

toberberine erscheinen auch die Einsatzmöglichkeiten der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase vielversprechend. Wesentlich dafür ist die absolute Stereospezifität des Enzyms. Da STOX in racemischen Substratlösungen das jeweilige (S)-Enantiomer oxidiert, das (R)-konfigurierte Substrat aber unverändert läßt, lassen sich nach Abtrennung des oxidierten Produkts damit optisch reine Substanzen ohne aufwendige Co-Kristallisation mit chiralen Verbindungen auch im analytischen Maßstab gewinnen. Die chemische Reduktion des oxidierten Enzymprodukts liefert wieder das racemische Ausgangsprodukt, wobei durch die Wahl eines geeigneten Reduktionsmittels Wasserstoff-Isotope am chiralen C-1 eingebaut werden können. Abbildung 59 illustriert, daß durch mehrfache Wieder-

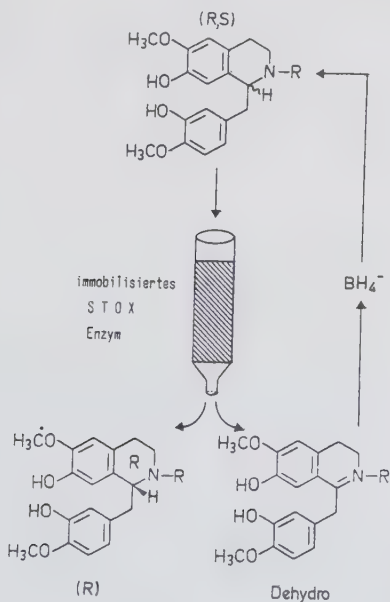


Abbildung 59 Schematische Darstellung eines Kreisprozesses zur Überführung eines Norretikulins-Razemats in das (R)-Enantiomer. Das Verfahren kombiniert die (S)-Stereospezifität des immobilisierten STOX-Enzyms mit der stereounspezifischen chemischen NaBH₄-Reduktion.

holung der stereospezifischen enzymatischen Oxidation mit nachfolgender stereounspezifischer Reduktion ein Benzylisochinolin-Razemat in das (R)-Enantiomere quantitativ überführt werden kann. Das interessanteste Substrat für diese Reaktion ist das von RICE (1985) für die (R)-(-)-Morphin-Synthese verwendete 1-(3'-Hydroxy-4'-Hydroxymethylbenzyl) 6-Hydroxymethyltetrahydroisochinolin, welches im schwach Sauren gut löslich, in alkalischer, wässriger Umgebung fast unlöslich ist. Zwar konnte die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase erfolgreich immobilisiert werden, ihre Lagerstabilität konnte dadurch gegenüber dem gelöst vorliegenden Enzym 50-fach gesteigert werden, doch wurde mit der Bindung an die Trägermatrix das pH-Optimum des Enzyms um eine halbe pH-Einheit ins Alkalische verschoben, was eine präparative Darstellung des (R)-Enantiomeren der oben angeführten Verbindung aufs äußerste erschwert. Das Problem der Substratlöslichkeit durch Verlagerung der enzymatischen Reaktion aus dem wässrigen Milieu in ein wasserfreies organisches Lösungsmittel zu lösen, erscheint prinzipiell möglich, wenngleich die erzielten Umsatzraten gegenüber dem wässrigen System um annähernd drei Größenordnungen geringer waren. Präzise Kenntnisse der molekularen Struktur der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase wären nötig, um diese Schwierigkeiten zu überwinden. Die Klonierung des STOX-Gens ist unter diesem Gesichtspunkt von größter Wichtigkeit. Über gezielte Mutagenese könnte dann in weiterführenden Arbeiten die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase im Hinblick auf die biotechnologisch erwünschten Eigenschaften optimiert werden.

Die zuletzt diskutierten Probleme zeigen, wie leicht man durch das Studium einer eher akademischen Fragestellung an einen Punkt gelangen kann, an dem man unversehens an einem Fenster des wissenschaftlichen Elfenbeinturms steht. Erinnern sollten wir uns dann des Gedankens, welchen Johann Wolfgang von Goethe formuliert:

"Es ist nicht genug zu wissen, man muß es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen, man muß es auch tun."

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein neues Enzym, die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (STOX) konnte entdeckt und beschrieben werden, welches eine zentrale Rolle in der enzymatischen Oxidation von Benzylisochinolin-Alkaloiden spielt. Mit unmarkierten und zwei geeignet [^3H]-markierten Alkaloiden aus der Gruppe der Tetrahydroprotoberberine und 1-Benzylisochinoline wurden qualitative und quantitative Enzymtestsysteme aufgebaut, die die Reinigung und Charakterisierung des Enzyms erlaubten.
2. In Zellkulturen und differenzierten Pflanzen (frisch oder herbarisiert) aus 5 Protoberberine-enthaltenden Pflanzenfamilien konnte STOX über Enzymtests oder Immunoblotting nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 4.5 ng STOX-Protein). Eine Zellsuspensionskultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata wurde als geeignetstes Material zur Gewinnung von STOX ausgewählt und diese auch ultrastrukturell analysiert.
3. In einem 5-stufigen Reinigungsverfahren wurde mit 25% Ausbeute das Enzym bis zur Homogenität 155-fach angereichert. Daneben wurde die analytische STOX-Präparation über Immunoaffinitäts-Chromatographie mit monoklonalen Antikörpern beschrieben, wie auch eine Methode zur schnellen präparativen Darstellung größerer Mengen an STOX.
4. Das Enzym oxidiert unter stöchiometrischem Sauerstoffverbrauch absolut stereospezifisch die (S)-Enantiomere zweier verschiedener Alkaloidgruppen, der 1-Benzylisochinoline und Tetrahydroprotoberberine, zu den 1,2-Dehydro-Benzylisochinolininen bzw. den quaternären Protoberberinen. Quaternäre Tetrahydroprotoberberine können enzymatisch nicht oxidiert werden, da als Reaktionsintermediat eine Iminiumstruktur und kein Enamin ausgebildet wird.

5. Die enzymatische Übertragung der Reduktionsäquivalente vom reduzierten Substrat auf O_2 führt zur stöchiometrischen Bildung von H_2O_2 . Als prosthetische Gruppe ist dabei ein kovalent an das Enzym gebundener Flavinrest beteiligt, welcher höchstwahrscheinlich im stabilen Grundzustand reduziert vorliegt.
6. STOX kommt nativ überwiegend als 105 kD großes dimeres Protein vor, dessen Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen zu 53 kD bestimmbar ist. Seine optimale katalytische Aktivität zeigt das Enzym bei 40°C und pH 8.9. 5% der zellulären STOX-Aktivität entfallen auf eine immunologisch kreuzreagierende 45 kD große STOX-Aktivität.
7. Das Substitutionsmuster der 1-Benzylisochinoline am Benzylring wie am Isochinolin-Kohlenstoff 6 und 7 spielt für die enzymatische Oxidierbarkeit keine entscheidende Rolle. Entsprechendes gilt hinsichtlich der A- und D-Ring-Substituenten der Tetrahydroprotoberberine. N-Methylierung der 1-Benzylisochinoline und Modifizierung von C-1 und C-13 des Tetrahydroprotoberberin-Gerüsts machen diese Verbindungen zu enzymatisch schlecht oder gar nicht oxidierbaren Substraten.
8. Die Enzymaktivität wird durch Protoberberine, H_2O_2 , Acetylaceton und Morin gehemmt. SH-alkylierende Agenzien hemmen im Gegensatz zu Hg^{++} , Cd^{++} und Ag^{++} die katalytische Aktivität nicht. Metalle sind für die enzymatische Oxidation nicht essentiell.
9. In der Zelle liegt STOX ausschließlich vesikulär kompartimentiert vor. Zum ersten Mal wird für ein Enzym des Sekundärstoffwechsels die Reinigung und morphologische Charakterisierung eines subzellulären Kompartiments beschrieben, das ausschließlich der Alkaloidbildung zu dienen scheint. Mit drei verschiedenen Trenntechniken lassen sich elektro-nmikroskopisch einheitliche 0.1 - 1 μm große glatte

Vesikel präparieren, welche neben ca. 20 Proteinen auch Protoberberin-Alkaloide enthalten.

10. Biotransformations-Experimente führten zu einer ultrastrukturellen Modellvorstellung der Berberin-Biosynthese, welche das Zusammenspiel cytoplasmatischer und vesikulär kompartimentierter Enzyme erfordert. Kernpunkt dieses Konzepts ist die Impermeabilität der Vesikel für intravesikulär durch STOX-Katalyse gebildete quaternäre Protoberberine bei gleichzeitiger Permeabilität für reduzierte Tetrahydroprotoberberine und 1-Benzylisochinoline. Während letztere von cytoplasmatischen Enzymen umgesetzt werden können, erfolgen alle enzymatischen Veränderungen der oxidierten Formen ausschließlich im Vesikelinneren.
11. Die Immobilisierung intakter Berberis-Zellen und zellfreier STOX-Präparationen wurde mit 10 verschiedenen Techniken versucht. Mit einer anorganischen Glasmatrix konnte die Haltbarkeit der Lagerstabilität von STOX gegenüber dem gelösten Enzym um den Faktor 50 auf 200 Tage gesteigert werden. Durch die Immobilisierung verschieben sich pH- und Temperatur-Optima, während die K_M -Werte unverändert bleiben.
12. In wasserfreien organischen Lösungsmitteln zeigt STOX nur noch maximal 0.2% seiner im wässrigen Milieu meßbaren Aktivität. Schließlich wird die im Hinblick auf die Morphinbiosynthese biotechnologisch interessante Überführung eines Norretikulinrazemats in das (R)-Enantiomer beschrieben. Der Kreisprozeß koppelt die Stereospezifität des immobilisierten STOX mit der stereounspezifischen chemischen NaBH_4 -Reduktion.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- AEBI, H.H.: Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3. Bergmeyer, J., Graßl, M. (eds.). Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida (1983) 273-286.
- AHERN, T.J., KLIBANOV, A.M.: The Mechanism of Irreversible Enzyme Inactivation at 100°C. *Science* 228 (1984) 1280-1284.
- ALFERMANN, A.W., REINHARD, E.: Biotransformation by Plant Tissue Cultures. *Dev. Plant Biol.* 5 (1980) 399-404.
- ALLEN, R.D., ALLEN, N.S., TRAVIS, J.T.: Video-Enhanced Contrast, Differential Interference Contrast (AVEC-DIC) Microscopy: A New Method Capable of Analyzing Microtubule - Related Motility in the Reticulopodial Network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motility* 1 (1981) 291-302.
- AMANN, M.: Untersuchungen zur Konfigurationsumkehr in der Morphinbiosynthese. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1982).
- AMANN, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Tetrahydroprotoberberine Oxidase, the Final Enzyme in Protoberberine Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 953-954.
- AMANN, M., WANNER, G., ZENK, M.H.: Intracellular Compartmentation of two Key Enzymes of Berberine Biosynthesis in Plant Cell Culture. *Planta* (1986) im Druck.
- AMANN, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: S-Tetrahydroprotoberberinoxidase, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung. Deutsche Patentanmeldung P 3406 774.4, Int.Nr.: Co 8402.
- ANGELETTI, R.H., NOLAN, J.A., ZAREMBA, S.: Catecholamin Storage Vesicles: Topography and Function. *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985) 240-243.
- ARTISS, J.D., ZAKS, B.: A Sensitive Reaction for Dilute Cholesterol Determinations. *Microchem. J.* 25 (1981) 535-542.
- AUSTER, F., SCHÄFER, J.: Arzneipflanzen (20. Lieferung Nr. 53). VEB Georg Thieme, Leipzig (1958).
- AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.: Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature* 214 (1967) 1302-1304.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S., BOLLINGER, W.H.: Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science* 228 (1985) 1154-1160.

- BARTON, D.H.R., COHEN, T.: Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation. Festschrift Arthur Stoll. Birkhäuser Verlag Basel (1957) 117-144.
- BASMADJIAN, G.P., HUSSAIN, S.F., PAUL, A.G.: Biosynthetic Relationships Between Phenylethylamine and Tetrahydroisoquinoline Alkaloids in Peyote. *Lloydia* 41 (1978) 375-380.
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., FRANCIS, R.J., McCALDIN, D.J., RAMUZ, H.: Alkaloid Biosynthesis, Part IV. 1-Benzylisoquinolines as Precursors of Theabin, Codeine and Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* (1964) 3600-3610.
- BATTERSBY, A.R., FOULKES, D.M., BINKS, R.: Alkaloid Biosynthesis, Part. VIII. Use of Optically Active Precursors for Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. *J. Chem. Soc.* (1965) 3323-3332.
- BATTERSBY, A.R., SOUTHGATE, R., STAUNTON, J., HIRST, M.: Synthesis of (+)- and (-)-Scoulerine and of (+)- and (-)-Coreximine. *J. Chem. Soc. (C)* (1966) 1052-1057.
- BATTERSBY, A.R., STAUNTON, J., WILTSHIRE, H.R., BIRCHER, B.J., FUGANTI, C.: Studies of Enzyme-mediated Reactions, Part V. Synthesis of (13S)- and (13R)-($13\text{-}^3\text{H}_4$)-Scoulerine from Stereospecifically Labelled (R)- and (S)-($\alpha\text{-}^3\text{H}_4$)-Benzyl Alcohols; Stereochemistry of Enzymic Reactions at Saturated Benzylic Carbon. *J. Chem. Soc. Perkin I* (1975) 1162-1171.
- BAUMERT, A., HIEKE, M., GRÖGER, D.: N-Methylation of Anthranilic Acid to N-Methyl-Anthranilic Acid by Cell-free Extract of *Ruta graveolens* Tissue Cultures. *Planta Med.* 48 (1983) 258-262.
- BEECHER, C.W.W., KELLEHER, W.J.: The Incorporation of Berberine into Jatrorrhizine. *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 469-472.
- BEECHER, C.W.W., KELLEHER, W.J.: Enzymatic Study of the Late Stages of Protoberberine Alkaloid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 4595-4598.
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 70 (1976) 241-250.
- BERGER, R.: Immobilisierung mikrobieller Zellen und deren Nutzung zur Substratumwandlung - Eine Literaturstudie. *Acta Biotechn.* 2 (1982) 343-358.
- BERGMAYER, H.U.: Enzymatische Analyse neuer Generation. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 319 (1984) 883-889.
- BERLIN, J.: Naturstoffe aus pflanzlichen Zellkulturen. *Chemie i. u. Zeit* 17 (1983) 77-84.

- BERLIN, J.: Plant Cell Cultures - a Future Source of Natural Products. *Endeavour* 8 (1984) 5-8.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H., LOVE, R.H.: The Fluorimetric Measurement of the Nucleotides of Riboflavin and their Concentration in Tissues. *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 755-769.
- BIEMANN, K.: Mass spectrometry. Organic Chemical Applications. McGraw-Hill Book Company, New York, San Francisco, Toronto, London (1962) 223-231.
- BISSET, N.G.: Plants as a Source of Isoquinoline Alkaloids. In: *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Philippon, D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg (1985) 1-22.
- BORKOWSKI, P.R., HORN, J.S., RAPOPORT, H.: Role of 1,2-Dehydroreticulium Ion in the Biosynthetic Conversion of Reti-culine to Thebaine. *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 276-281.
- BOWLES, D.J., KAUSS, H.: Characterisation, Enzymatic and Lectin Properties of Isolated Membranes from *Phaseolus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* 443 (1976) 360-374.
- BOWLES, D.J., QUAIL, P.H., MORRE, D.J., HARTMANN, G.C.: Use of Markers in Plant Cell Fractionation. In: *Plant Organelles*. Reid, E. (ed.). Ellis Horwood Limited, Chichester (1979) 207-224.
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Mikrogramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- BREIDENBACH, R.W., BEEVERS, H.: Assoziation of the Glyoxalate Cycle Enzymes in a Novel Subcellular Particle from Castor Bean Endosperm. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 462-469.
- BREULING, M., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E.: Cultivation of Cell Cultures of *Berberis wilsoniae* in 20-l Airlift Bio-reactors. *Plant Cell Reports* 4 (1985) 220-223.
- BRIGGS, G.E., HALDANE, J.B.S.: A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* 19 (1925) 338-339.
- BRODELIUS, P., DEUS, B., MOSBACH, K., ZENK, M.H.: Immobilized Plant Cells for the Production and Transformation of Natural Products. *FEBS Letters* 103 (1979) 93-97.
- BROUN, G.B.: Chemically Aggregated Enzymes. In: *Methods Enzymol.* 44, Mosbach K. (ed.) Acad. Press New York San Francisco (1976) 263-280.

- BROWN, P., HORNBECK, C.L., CRONIN, J.R.: Alloxazines and Isoalloxazines. Mass Spectrometric Analysis of Riboflavin and Related Compounds. *Org. Mass Spectrom.* 6 (1972) 1383-1399.
- BUCHS, P., BROSSI, A.: Aromatization of 1-Benzyltetrahydro-Isoquinolines: Racemization of (-)-(S)-(N-nor)-Reticuline. *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 381-386.
- BURNETTE, W.N.: "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl - Sulfate - Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203.
- CAMPBELL, I.M.: Fungal Secondary Metabolism Research: Past, Present, Future. *J. Nat. Prod.* 46 (1983) 60-70.
- CARMICHAEL, S.W., WINKLER, H.: Die chromaffinen Zellen der Nebenniere. *Spektrum der Wissenschaft* 10 (1985) 70-82.
- CAVA, M.P., REED, T.A., BEAL, J.L.: An Efficient Separation of the Common Alkaloids of the Berberine Group; the Isolation and Characterization of Columbamine. *Lloydia* 28 (1965) 73-83.
- CASHAW, J.L., RUCHIRAWAT, S., NIMIT, Y., DAVIS, V.E.: Chemical Ionisation Mass Spectra of Derivatized 1-Benzyltetrahydro-Isoquinoline Alkaloids. *Biomed. Mass Spectrometry* 11 (1984) 63-67.
- CHAN, A.H., COTTER, D.A.: An Improved Coupled Assay for Detecting Glucose Released by Acid Glucosidases. *Microbios Letter* 15 (1980) 7-15.
- CHEN, C.-Y., MacLEAN, D.B.: Mass Spectra and Proton Magnetic Resonance Spectra of Some Tetrahydroprotoberberine Alkaloids. *Can. J. Chem.* 46 (1968) 2501-2506.
- CHIBATA, J., TOSA, T., MORI, T.: Production of L-Amino Acids by Aminoacylase Adsorbed on DEAE-Sephadex. In: *Methods in Enzymology* 44, Mosbach, K. (ed.) Academic Press New York (1976) 746-759.
- COLLINS, M.A., NIJM., W.P. BERGE, G.F., TEAS, G., GOLDFARB, C.: Dopamine -related Tetrahydroisoquinolines: Significant Urinary Excretion by Alcoholics after Alcohol Consumption. *Science* 206 (1979) 1184-1186.
- CORDELL, G.A.: *Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach.* John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1981).
- COUTTS, J.G.C., HAMBLIN, M.R., TINLEY, E.J., BOBBITT, J.M.: The Enzymatic Oxidation of Phenolic Tetrahydroisoquinoline -1-carboxylic Acids. *J. Chem. Soc. Perkin I* (1979) 2744-2750.

- CRUEGER, W., CRUEGER, A.: Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Oldenbourg Verlag München Wien (1984).
- DALY, J.W.: Alkaloids of Neotropical Poison Frogs (Dendrobatidae). In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 41. Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W. (eds.) Springer-Verlag Wien New York (1982) 205-340.
- DAYHOFF, M.O.: Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5. Natl. Biomed. Res. Found. Washington (1972). Suppl. 2 (1976).
- DECKER, K.: Biosynthesis of Covalent Flavoproteins. In: Flavins and Flavoproteins. Massey, V., Williams, C.H.Jr. (eds.). Elsevier, North Holland, New York Amsterdam Oxford (1982) 465-472.
- DEUS, B.: Stoffwechselleistungen varianter Stämme pflanzlicher Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1980).
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: Instability of Indol Alkaloid Production in Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. Planta Med. 50 (1984 a) 427-431.
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: A Highly Selective Alkaloid Uptake System in Vacuoles of Higher Plants. Planta 162 (1984 b) 250-260.
- DORNREITER, I.: Monoklonale Antikörper gegen Katalase aus Papaver somniferum und Berberinsynthese aus Berberis stolonifera Zellkultur. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1985).
- DRAGENDORFF, G.: Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten. Werner Fritsch, München (1967).
- DUMPHY, W.G., ROTHMAN, J.E.: Compartmental Organization of the Golgi Stack. Cell 42 (1985) 13-21.
- DURAND, R., ZENK, M.H.: Enzymes of the Homogentisate Ring-Cleavage Pathway in Cell Suspension Cultures of Higher Plants. FEBS Lett. 39 (1974) 218-224.
- EGERER, P., BÜHLER, M., SIMON, H.: Rhein as an Electron Acceptor for Various Flavoproteins and for Electron Transport Particles. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362 (1982) 627-633.
- EGERER, P., Simon, H.: Isotopic and Kinetic Studies and Influence of Dicoumarol on the Soluble Hydrogenase from Alcaligenes eutrophus H16. Biochim. Biophys. Acta 703 (1982) 158-170.

- EHRESMANN, B., IMBAULT, P., WEIL, J.H.: Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. Anal. Biochem. 54 (1973) 454-463.
- EILERT, U., KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F.: Stimulation of Sanguinarine Accumulation in Papaver somniferum Cell Cultures by Fungal Elicitors. J. Plant Physiol. 119 (1985) 65-76.
- ELLIOTT, J.W.: Conversion of Berberiniumchlorid to the Stereoisomeric Ophiocarpines. J. Heterocyclic Chem. 4 (1967) 639-640.
- FAHN, W., GUNDLACH, H., DEUS-NEUMANN, B., STÖCKIGT, J.: Late Enzymes of Vindoline Biosynthesis. Acetyl-CoA: 17-O-Acetyl-vindoline 17-O-Acetyl-Transferase. Plant Cell Reports 4 (1985) 333-336.
- FAIRBAIRN, J.W., STEELE, M.H.: Biosynthetic and Metabolic Activities of Some Organelles in Papaver somniferum Latex. Phytochemistry 20 (1981) 1031-1036.
- FARNSWORTH, N.R.: The Role of Medicinal Plants in Drug Development. In: Natural Products and Drug Development. Krogsgaard-Larsen, P., Brøgger Christensen, S., Kofod, H. (eds.) Munksgaard, Copenhagen (1984) 17-28.
- FARNSWORTH, N.R., MORRIS, R.W.: Higher Plants - the Sleeping Giant of Drug Development. Am. J. Pharmacy 148 (1976) 46-52.
- FERSHT, A.: Enzyme Structure and Mechanism. Freeman and Company New York (1985) 155-175.
- FLOSS, H.G., TSAI, M.: Chiral Methyl Groups. In: Advances in Enzymology, Vol. 50, Meister, A. (ed.) Wiley & Sons, Inc. (1979) 243-302.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag
- FRAENKEL, G.S.: The Raison d'Etre of Secondary Plant Products. Science 129 (1959) 1466-1470.
- FRIEDMAN, J., WALLER, G.R.: Allelopathy and Autotoxicity. Trends Biochem. Science 110 (1985) 47-50.
- FRISCHKNECHT, P.M., BAUMANN, T.W.: Stress Induced Formation of Purine Alkaloids in Plant Tissue Culture of Coffea arabica. Phytochemistry 24, (1985) 2255-2257.
- FU, P., KOBUS, J., ROBINSON, T.: The Multiplicity of Pyridinium Oxidases in Ricinus communis. Phytochemistry 11 (1972) 105-112.

- FUJITA, Y., HARA, Y.: The Effective Production of Shikonin by Cultures of an Increased Cell Population. *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 2071-2075.
- FUJITA, Y., HARA, Y., SUGA, C., MORIMOTO, T.: Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of Lithospermum erythrorhizon. *Plant Cell Reports* 1 (1981) 61-63.
- FUKUI, S., TANAKA, A.: Enzymic Reactions in Organic Solvents. *Endeavour* 9 (1985) 10-17
- FURST, P.T.: Peyote und die Huichol-Indianer in Mexiko. In: Rausch und Realität, Bd. 2, Völger, G., v. Welck, K. (eds.) Rowohlt Verlag Hamburg (1982) 801-815.
- FURUYA, T., NAKANO, M., YOSHIKAWA, T.: Biotransformation of R,S-Reticuline and Morphinan Alkaloids by Cell Cultures of Papaver somniferum. *Phytochemistry* 17 (1978) 891-893.
- GERSHONI, J.M., PALADE, G.E.: Protein Blotting: Principles and Applications. *Anal. Biochem.* 131 (1983) 1-15.
- GILBERT, H.F., O'Leary, M.H.: Modification of Arginine and Lysine in Proteins with 2,4-Pentanedione. *Biochemistry* 14 (1975) 5194-5199.
- V. GOETHE, J.W.: Faust. Der Tragödie erster Teil (1808) 1230-1231.
- GOLDSTEIN, A., BARRETT, R.W., JAMES, I.F., LOWNEY, L.I., WEITZ, C., KNIPMEYER, L.L., RAPOPORT, H.: Morphine and Other Opiates from Beet Brain and Adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 5203-5207.
- GOODWIN, T.W., MERCER, E.J.: Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press Oxford New York (1983).
- GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.: Methode Permettant l'Etude Conjugée des propriétés Electrophoretiques et Immunochimiques d'un Mélange de Proteines. Application au Serum Sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 10 (1953) 193-194.
- GREEN, J.R.: The Golgi Apparatus. In: Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Hall, J.L., Moore, A.L. (eds.) Acad. Press London New York (1983) 135-152.
- GRILL, E., WINNACKER, E.-L., ZENK, M.H.: Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230 (1985) 674-676.
- GUINAUDEAU, H., FREYER, A.J., SHAMMA, M.: Enzymic Control of Stereochemistry Among the Thalictrum Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Tetrahedron* 40 (1984) 1975-1982.

- HAHN, E.F., KREY, A.K.: The Interaction of Alkaloids with DNA. In: Progress in Molecular and Subcellular Biology 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1971) 134-151.
- HAHN, F.E., CIAK, J.: Antibiotics, Vol. 3. Gottlieb, D., Shaw, A.D., Corcoran, J.W. (eds.) Springer Verlag, New York (1975).
- HAHN, G., STIEHL, K.: Über β -(Oxy-phenyl)-äthylamine und ihre Umwandlungen. Synthese von Tetrahydroisochinolin-carbonsäuren und die spontane Decarboxylierung von α -Ketosäuren unter physiologischen Bedingungen. Chem. Ber. 69 (1936) 2627-2654.
- HALL, J.L., MOORE, A.L. (eds.): Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Acad. Press London New York (1983).
- HANNIBAL-FRIEDRICH, O., CHUN, M., SERNETZ, M.: Immobilization of β -Galactosidase, Albumin, and γ -Globulin on Epoxy-Activated Acrylic Beads. Biotechnol. Bioeng. 22 (1980) 157-175.
- HAMES, B.D., RICKWOOD, D.: Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. IRL Press Limited, London Washington DC (1981).
- HARBORNE, J.B.: Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press London (1982).
- HARRISON, R.G., CONNOLLY, R.C., ABDALLA, A.: Kinship of Smenkhkare and Tutankhamen Affirmed by Serological Micromethod. Nature 224 (1969) 325-326.
- HARTMANN, T.: Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Plant Syst. Evol. 150 (1985) 15-34.
- HARTMEIER, W.: Immobilisierte Biokatalysatoren - auf dem Weg zur zweiten Generation. Naturwissenschaften 72 (1985 a) 310-314.
- HARTMEIER, W.: Immobilized Biocatalysts - from Simple to Complex Systems. Trends Biotechnol. 3 (1985 b) 149-153.
- HAYASHI, S., NAKAMURA, S., SUZUKI, M.: Corynebacterium Sarcosine Oxidase: A Unique Enzyme Having Covalently-bound and Noncovalently-bound Flavins. Biochem.Biophys. Res. Commun. 96 (1980) 924-930.
- HEMSCHIEDT, T., ZENK, M.H.: Glucosidases Involved in Indol Alkaloid Biosynthesis of Catharanthus Cell Cultures. FEBS Lett. 110 (1980) 187-191.

- HEMSCHEIDT, T., ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of a NADPH Dependent Tetrahydroalstonine Synthase from Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. Plant Cell Reports 4 (1985) 216-219.
- HILL, R.L., BRADSHAW, R.A.: Fumarase. In: Methods Enzymol. 13. Lowenstein, J.M. (ed.) Acad. Press New York London (1969) 91-99.
- HINZ, H., ZENK, M.H.: Production of Protoberberine Alkaloids by Cell Suspension Cultures of Berberis Species. Naturwissenschaften 67 (1981) 620.
- HIROAKA, N., TABATA, N.: Alkaloid Production by Plants Regenerated from Cultured Cells of Datura innoxia. Phytochem. 13 (1974) 1671-1675.
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Enzymic Conversion of Reticuline to Salutaridine by Cell-free Systems of Papaver somniferum. Biochemistry 21 (1982) 3729-3734.
- HOLLAND, H., JEFFS, P., CAPPS, T.M., MacLEAN, D.B.: The Biosynthesis of Protoberberine and Related Isoquinoline Alkaloids. Can. J. Chem. 57 (1979) 1588-1597.
- HORWITZ, C. (ed.) Official Methods of Analysis of the Official Association of Analytical Chemists 12 (1975) 816-859.
- HUANG, A.H.C., TRELEASE, R.N., MOORE, Jr. T.S.: Plant Peroxisomes. Acad. Press New York London (1983) 15-31.
- HURN, B.A.L., CHANTLER, S.M.: Production of Reagent Antibodies. Methods Enzymol. 70. Vunakis, H.V., Langone, J.J. (eds.) Acad. Press New York London (1980) 104-142.
- IBELGAUFTS, H.: Das Jahrhundert des Klons. Geflügelte Worte. Nachr. Chem. Tech. Lab. 31 (1983) 282.
- ILO, M., MORIYAMA, A., MATSUMOTO, Y., TAKAKI, M., FUKUMOTO, M.: Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. Agric. Biol. Chem. 49 (1985) 2173-2176.
- IWASA, K., GUPTA, Y.P., CUSHMAN, M.: Absolute Configuration of the cis- and trans-13-Methyltetrahydroprotoberberines. Total Synthesis of (+)-Thalictricavine, (+)-Canadine, (+)-, (-)- and (+)-Cavidine. J. Org. Chem. 46 (1981) 4744-4750.
- KLIBANOV, A.M.: Enzyme Stabilization by Immobilization. Anal. Biochem. 93 (1979) 1-25.
- KOELEN, K.J., GROSS, G.G.: Partial Purification and Properties of Tropine Dehydrogenase from Root Cultures of Datura stramonium. Planta Med. 44 (1982) 227-230.

- KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity. *Nature* 256 (1975) 495-497.
- KÖST, H.-P.: Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycocerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1974).
- KOSTERLITZ, H.W.: Has Morphine a Physiological Function in the Animal Kingdom. *Nature* 317 (1985) 671.
- KOZIOL, J.: Fluorimetric Analyses of Riboflavin and its Coenzymes. In: *Methods Enzymol.* 18 B. McCormick, D.B., Wright, L.D. (eds.) Acad. Press New York London (1971) 253-285.
- KUEHN, G.D.: Some one - Hundred "Somes". *Trends Biochem. Sci.* (1985) 227-230.
- KURTH, R., MIKSCHY, U., PONDERA, Chr., LIZONOVA, A., BREDE, H.B., HELM, E.B., BERGMANN, L., FRANK, H., POPOVICH, M., GALLO, R.C.: HTLV-III Infektionen bei Patienten mit AIDS und Lymphadenopathiesyndrom. *Münchner Med. Wochenschrift* 126 (1984) 1363-1368.
- KUTCHAN, T.M., AYABE, S., COSCIA, C.J.: Cytodifferentiation and Papaver Alkaloid Accumulation. In: *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Philippon, D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.) Springer, Berlin Heidelberg (1985) 281-294.
- KUTNEY, J.P.: Plant Products Produced in Cell Culture. In: *Natural Products and Drug Development*. Krogsgaard-Larsen, P., Brøgger Christensen, S., Kofod, H. (eds.) Munksgaard, Copenhagen (1984) 46-64.
- LAYNE, E: Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods Enzymol.* Vol 3. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.) Acad. Press New York (1957) 447-454.
- LEHNINGER, A.L.: *Biochemie*. Verlag Chemie, Weinheim New York (1977) 391-416.
- LIN, J.-T., GRIFFITH, O.M., CORSE, J.W.: Subcellular Fractionation of Wheat Leaf Protoplasts by Centrifugal Elutriation. *Anal. Biochem.* 148 (1985) 10-14.
- LINDNER, E.: Structure Activities and Pharmacological Properties of the Opium Alkaloids. In: *The Chemistry and Biology of the Isoquinoline Alkaloids*. Philippon, D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verlag Berlin Heidelberg (1985) 38-46.

- LINDSEY, K., YEOMAN, M.M.: The Synthetic Potential of Immobilized Cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. *Planta* 162 (1984) 495-501.
- LINDSEY, K., YEOMAN, M.M., BLACK, G.M., MAVITUNA, F.: A Novel Method for the Immobilization and Culture of Plant Cells. *FEBS Lett.* 155 (1983) 143-149.
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The Determination of Enzyme Dissoziation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658-666.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 100-127.
- LORD: Endoplasmic Reticulum and Ribosomes. In: Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Hall, J.L., Moore, A.L. (eds.) *Acad. Press London New York* (1983) 119-134.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- LUCKNER, M.: Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo* (1984).
- MAHAJAN, V.M., SHARMA, A., RATTAN, A.: Antimycotic Activity of Berberin Sulphate: An Alkaloid from Indian Medicinal Herb. *Sabouraudia* 20 (1982) 79-81.
- MAROKO, P.R., ZALEWSKY, A., KROL, R., CHEUNG, W.: Protoberberine Alkaloids - A New Family of Inotropic Agents. *Clin. Res.* 30 (1982) 675.
- MASTERS, C.: Phosphofructokinase, Compartmentation and the Regulation of Glycolysis. *Trends Biochem. Sci.* 113 (1985) 189.
- MATILE, P.: Biochemistry and Function of Vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29 (1978) 193-213.
- MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Walter de Gruyter Berlin New York* (1971).
- MEISE, W.: 2,3-Dimethoxy-13,13 α -Dehydro-Berberin: Herstellung und spektroskopische Charakterisierung. *Liebigs Ann. Chem.* 748 (1971) 55-58.
- MESSING, R.A. (ed.): Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. *Acad. Press New York, San Francisco, London* (1975).

- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49 (1913) 333-369.
- MIRZA, R.: Reduction of Quaternized Isoquinoline Derivatives with Sodium Borohydride. J. Chem. Soc. (1957) 4400-4401.
- MISAWA, M.: Production of Useful Plant Metabolites. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 31. Plant Cell Culture. Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1985) 59-88.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M., TAMAKI, E.: Phytochemical Studies on Tobacco Alkaloids XIV. The Occurrence and Properties of Putrescine N-Methyltransferase in Tobacco Roots. Plant Cell Physiol. 12 (1971) 633-640.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M., TAMAKI, E.: N-Methylputrescine Oxidase from Tobacco Roots. Phytochemistry 11 (1972) 2757-2762.
- MOTHES, K.: Zur Geschichte unserer Kenntnisse über die Alkaloide. Pharmazie 36 (1981) 199-209.
- MOTHES, K., SCHÜTTE, H.R., LUCKNER, M. (eds.) Biochemistry of Alkaloids. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach (1985).
- MÜMLER, S., RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: S-Adenosyl-(L)-Methionine: (S)-Scoulerine 9-O-Methyltransferase, a Highly Stereo- and Regio Specific Enzyme in Tetrahydroprotoberberine Biosynthesis. Plant Cell Reports 4 (1985) 36-39.
- MURAKOSHI, I., OGAWA, M., TORIIZUKA, K., HAGINIWA, J., OHMIYA, S., OTOMASU, H.: The Enzymatic Conversion of (-) Lupinin to (-)-(trans-4'-Hydroxycinnamoyl)lupinin by Extracts of Lupinus seedlings. Chem. and Pharm. Bull. (Japan) 25 (1977) 527-529.
- MURRAY, A.: Japanese Researchers Report on Enzyme Engineering. Biotechnology (1984) 13-14.
- NAKAGAWA, K., KONAGAI, A., FUKUI, H., TABATA, M.: Release and Crystallization of Berberine in the Liquid Medium of Thalictrum minus Cell Suspension Cultures. Plant Cell Reports 3 (1984) 254-257.
- NAKAMURA, K., USHIO, K., OKA, S., OHNO, A., YASUI, S.: Stereochemical Control in Yeast Reduction. Tetrahedron Lett. 25 (1984) 3979-3982.
- NEUMANN, D., KRAUSS, G., HIEKE, M., GRÖGER, D.: Indole Alkaloid Formation and Storage in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. Planta Med. 48 (1983) 20-23.
- NEUPERT, H.: Interferenzkontrast - Einrichtung nach Nomarski (Lizenz CNRS), Zeiss Informationen 15 (1967).

- NIELSEN, P., RAUSCHENBACH, P., BACHER, A.: Phosphates of Riboflavin and Riboflavin Analogs: A Reinvestigation by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 130 (1983) 359-368.
- NILSSON, K., BIRNBAUM, S., FLYGARE, S., LINSE, L., SCHRÖDER, U., JEPPSSON, U., LARSSON, P.-O., MOSBACH, K., BRODELIUS, P.: A General Method for the Immobilization of Cells with Preserved Viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1983) 319-326.
- NILSSON, K., MOSBACH, K.: Immobilization of Enzymes and Affinity Ligands to Various Hydroxyl Group Carrying Supports Using Highly Reactive Sulfonyl Chlorides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 (1981) 449-457.
- NISHIMA, Y., SHIGA, K., TOJO, H., MIURA, R., YAMANO, T., WATARI, H.: A Study of D-Amino Acid Oxidase-Inhibitor Complexes by Resonance Raman Spectroscopy. In: *Flavins and Flavoproteins*. Massey, V., Williams, C.H.Jr. (eds.) Elsevier/North-Holland New York Amsterdam Oxford (1982) 550-553.
- NOZUE, M., YASUDA, H.: Occurrence of Anthocyanoblasts in Cell Suspension Cultures of Sweet Potato. *Plant Cell Reports* 4 (1985) 252-255.
- OHASHI, M., WILSON, J.M., BUDZIKIEWITCZ, H., SHAMMA, M., SLUSARCHYK, W.A., DJERASSI, C.: Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems XXXI. Aporphines and Related Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2807-2810.
- OHYAMA, K., UCHIDA, Y., MISAWA, N., KOMANO, T., FUJITA, M., UENO, T.: Oil Body Formation in *Euphorbia tirucalli* L. Cell Suspension Cultures. *Plant Cell Reports* 3 (1984) 21-22.
- OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-Gel Methods for Immunological Analysis. *Progr. in Allergie* 5 (1958) 1-78.
- PÄÄBO, S.: Molecular Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* 314 (1985) 644-645.
- PARA, G., LUCCIARDI, P., BARATTI, J.: Synthesis of L-tyrosine by Immobilized *Escherichia intermedia* Cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 (1985) 273-279.
- PATEL, D.G., TYE, A., PATIL, P.N., BURKMAN, A.M., BEAL, J.L.: Pharmacological Study of the Alkaloids 1-Canadine/Methochloride and α -Tembetarine Chloride. *Lloydia* 33 (1970) 36-42.
- PELOSI, L.A., ROTHER, A., EDWARDS, J.M.: The Effect of Light on the Production of *Heimia* Alkaloids. *Phytochemistry* 24 (1985) 2215-2218.

- PFITZNER, A.: Die Biosynthese der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Partial Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension Cultures of Catharanthus roseus. Phytochemistry 21 (1982) 1585-1588.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Vellosimin Reductase, a Specific Enzyme Involved in the Cell-free Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids. Tetrahedron Lett. 24 (1983 a) 1695-1698.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Polyneuridin Aldehyde Esterase: An Unusual Specific Enzyme Involved in the Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids. J. Chem. Soc. Chem. Comm. (1983 b) 459-460.
- PFITZNER, U.: Die Striktosidin-Synthase aus Catharanthus roseus Zellkulturen: Reinigung, immunologische Charakterisierung und Immobilisierung eines Enzyms aus dem Sedärstoffwechsel. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- PFITZNER, U., ZENK, M.H.: Immobilization of Strictosidine-Synthase from Catharanthus Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine. Planta Med. 46 (1982) 10-14.
- PRÄVE, P., FAUST, U., SITTIG, W., SUKATSCH, D.A. (eds.) Handbuch der Biotechnologie. Oldenbourg Verlag München Wien (1984).
- PRICE, C.A.: Centrifugation in Density Gradients. Acad. Press New York London (1982).
- RAFFAUF, R.F.: A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containing Plants. Wiley Interscience New York, London, Sidney, Toronto (1970).
- RAO, N.A., FELTON, S.P., HUENNEKENS, F.M., MACKLER, B.: Flavin Mononucleotide: The Coenzyme of Reduced Diphosphopyridin Nucleotide Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 238 (1963) 449-455.
- RAY, P.M., SHININGER, T., RAY, M.M.: Isolation of β -Glucan Synthetase Particles from Plant Cells and Identification with Golgi Membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. US 64 (1969) 605-612.
- RICE, K.C.: The Development of a Practical Total Synthesis of the Natural and Unnatural Codeine, Morphine and Thebaine. In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Philippon, D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.) Springer Berlin Heidelberg (1985) 191-203.

- RICE, K.C., BROSSI, A.: Expedient Synthesis of Racemic and Optically Active N-Norreticuline and N-Substituted and 6'-Bromo-N-Norreticulines. *J. Org. Chem.* (1980) 592-601.
- RINGDAHL, B., CHAN, R.P.K., CRAIG, J.C.: Protoberberine Alkaloids: Chiroptical Properties and Absolute Configuration. *J. Nat. Prod.* 44 (1981) 75-79.
- RIVAS, E., PSADELOUP, N., LE MAIRE, M.: A Single Step Method to Concentrate and Desalt Proteins which is also Useful for Determination of Detergent Finding to Membrane Proteins. *Anal. Biochem.* 123 (1982) 194-200.
- ROBERTS, M.F.: γ -Conicein Reductase from Conium maculatum. *Phytochemistry* 14 (1975) 2393-2397.
- ROBERTS, M.F.: Purification and Properties of (L)-Alanin: 5-Ketoctanal Aminotransferase from Conium maculatum. *Phytochemistry* 16 (1977) 1381-1386.
- ROBERTS, M.F., MCCARTHY, D., KUTCHAN, T.M., COSCIA, C.J.: Localization of Enzymes and Alkaloid Metabolites in Papaver Latex. *Arch. Biochem. Biophys.* 222 (1983) 599-609.
- ROGERS, S.O., BENDICH, A.J.: Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh Herbarium and Mummified Plant Tissue. *Plant Molec. Biol.* 5 (1985) 69-76.
- RUANGRUNGSI, N., WONGPANICH, V., TANTIVATANA, P., COWE, H.J., COX, P.J., FUNAGAMA, S., CORDELL, G.A.: Traditional Medicinal Plants of Thailand V. Ancistotectorine, a New Naphthalene-Isoquinoline Alkaloid from Ancistrocladus tectorius. *J. Nat. Prod.* 48 (1985) 529-535.
- RÜFFER, M.: The Production of Isoquinoline Alkaloids by Plant Cell Cultures. In: *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Philippon, D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verlag Berlin Heidelberg (1985) 265-280.
- RÜFFER, M., EKUNDAYO, O., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Biosynthesis of the Protoberberine Alkaloid Jatrorrhizine. *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 2643-2644.
- RÜFFER, M., EL-SHAGI, H., ZENK, M.H.: (S)-Norlaudanoline Synthase: The First Enzyme in the Benzyloisoquinoline Biosynthetic Pathway. *FEBS Lett.* 129 (1981) 5-9.
- RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of S-Adenosylmethionine: (R), (S)-Norlaudanoline-6-O-Methyltransferase from Argemone platyceras Cell Cultures. *Planta Med.* 49 (1983) 131-137.
- RÜFFER, M., ZENK, M.H.: Berberine Synthase, the Methylene-dioxy Group Forming Enzyme in Berberine Synthesis. *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 201-202.

- RUSH, M.D., KUTCHAN, T.M., COSCIA, C.J.: Correlation of the Appearance of Morphinan Alkaloids and Laticifer Cells in Germinating Papaver bracteatum Seedlings. Plant Cell Reports 4 (1985) 237-240.
- SATO, F., YAMADA, Y.: High Berberine-Producing Cultures of Coptis japonica Cells. Phytochemistry 23 (1984) 281-285.
- SCANDALIOS, J.G., TONG, W.F., ROUPAKIAS, D.G.: Cat 3, a Third Gene Locus Coding for a Tissue-specific Catalase in Maize: Genetics, Intracellular Location and Some Biochemical Properties. Mol. Gen. Genet. 179 (1980) 33-41.
- SCHIFF, Jr., P.L.: Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. J. Nat. Prod. 46 (1983) 1-43.
- SCHÜBEL, H. STÖCKIGT, J., FEICHT, H., SIMON, H.: Partial Purification and Characterization of Raucaffricine β -D-Glucosidase from Plant Cell Suspension Cultures of Rauwolfia serpentina Benth. Helv. Chim. Acta, im Druck.
- SCHUMACHER, H.-M., RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudanosoline Synthase from Eschscholzia tenuifolia Cell Cultures. Planta Med. 48 (1983) 212-220.
- SEGREST, J.P., JACKSON, R.L.: Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate. Methods Enzymol. XXVIII B. Ginsburg (ed.) Acad. Press New York London (1972) 54-63.
- SERTÜRNER, F.W.A.: Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. J. Pharm. Ärzte Apotheker Chem. 14/1 (1806) 47-93.
- SHAMMA, M.: The Isoquinoline Alkaloids. Acad. Press New York London (1972).
- SINGER, T.P., EDMONDSON, D.E.: Structure, Properties, and Determination of Covalently Bound Flavins. In: Methods Enzymol. 66, McCormick, D.B., Wright, L.D. (eds.) Acad. Press New York London (1980) 253-264.
- SNYDER, S.H., HENDLEY, E.D.: Sensitive Fluorimetric and Radiometric Assays for Monoamine Oxidase and Diamine Oxidase. Methods Enzymol. XVII B. Tabor, H., Tabor, C.W. (eds.) Acad. Press New York London (1971) 741-746.
- SOHAR, P.W., SCHOENEWALDT, E.F.W.: Zerlegung von razemischem Retikulin und Razemisierung seiner Enantiomere. Deutsche Patentanmeldung P 24 36 686.7, Merck & Co. Inc., Rahway, N.J. (USA) (1974).

- SPENSER, I.D.: Stereochemical Aspects of the Biosynthetic Routes Leading to the Pyrrolizidine and the Quinolizidine Alkaloids. *Pure and Appl. Chem.* 57 (1985) 453-470.
- SPURR, A.R.: A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *J. Ultrastructure Research* 26 (1969) 31-43.
- STAUNTON, J.: Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids. *Planta Med.* 36 (1979) 1-20.
- STEFFENS, P.: Reinigung und Charakterisierung des Berberinbrückenenzym aus Zellkulturen von *Berberis beaniana* Schneid. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- STEFFENS, P., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Purification and Characterization of the Berberine Bridge Enzyme from *Berberis beaniana* Cell Cultures. *Phytochemistry* 24 (1985) 2577-2583.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K.: Growth and Organized Development of Cultured Cells II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *Am. J. Bot.* 45 (1958) 705-708.
- STICK, K., EBERMANN, R.: Investigation of Hydrogen Peroxide Formation in Plants. *Phytochemistry* 23 (1984) 2719-2722.
- SUFFNESS, M., CORDELL, G.A.: Antitumor Alkaloids. In: *The Alkaloids*, Vol. 25. Brossi, A. (ed.) Acad. Press Orlando San Diego (1985) 188-198.
- SUZUKI, T., IWAI, K.: Constituents of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Food Science of the Pungent Principle of *Capsicum* Species. In: *The Alkaloids*, Vol. XXIII. Brossi, A. (ed.) Acad. Press Orlando San Diego New York (1984) 227-299.
- SZANTAY, C., BLASKO, G., BARCZAI-BEKE, M., DÖRNYEI, G., PECHY, P.: Studies on the Synthesis of Morphine VI. *Planta Med.* 48 (1983) 207-211.
- TANAHASHI, T., ZENK, M.H.: Isoquinoline Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Fumaria capreolata*. *Plant Cell Reports* 4 (1985) 96-99.
- TAUSSKY, H.H., SHORR, E.: A Microcolorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202 (1953) 675-685.
- THOMAS, J., TRELEASE, R.N.: Cytochemical Localization of Glycolate Oxidase in Microbodies (Glyoxysomes and Peroxisomes) of Higher Plant Tissues with the $CeCl_3$ Technique. *Protoplasma* 108 (1981) 39-53.

- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J.: Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamid Gels to Nitro-cellulose Sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354.
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Purification and Properties of Strictosidine-Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. Eur. J. Biochem. 101 (1979) 225-233.
- TSUKUDA, M., TABATA, M.: Intracellular Localization and Secretion of Naphthoquinone Pigments in Cell Cultures of Lithospermum erythrorhizon. Planta Med. 51 (1984) 338-341.
- UDENFRIED, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine. Horecker, B., Kaplan, N.O., Scheraga, H.A. (eds.) Acad. Press New York London (1962) 237-245.
- ULRICOVA, J., WALTEROVA, D., PREININGER, V., SIMANEK, V.: Inhibition of Butyrylcholinesterase Activity by Some Isoquinoline Alkaloids. Planta Med. 48 (1983) 174-177.
- VAGUJFALVI, D., STIFTER-PETZ, M.: Enzymatic Transformations of Morphinane Alkaloids. Phytochemistry 21 (1982) 1533-1536.
- VIGIL, E.L.: Intracellular Localization of Catalase (Peroxidatic) Activity in Plant Microbodies. J. Histochem. Cytochem. 17 (1969) 425-428.
- WAHL, R., GEISLER, W., MAASCH, H.J.: Comparison of Classical Lowry, Modified Lowry and a Dye-binding Assay for the Estimation of Protein in Allergen Extracts and Influence of Different Parameters on the Modified Lowry Assay. Biol. Chem., Hoppe-Seyler 366 (1985) 979-984.
- WALLER, G.R., MacVEAN, C.D., SUZUKI, T.: High Production of Caffeine and Related Enzyme Activities in Callus Cultures of Coffea arabica L. Plant Cell Reports 2 (1983) 109-112.
- WALLSCHLÄGER, D.: Monoklonale Antikörper gegen (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) und Peroxydase (POD) aus Pflanzen. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (1984).
- WALSH, C.: Enzymatic Reaction Mechanism. Freeman and Company San Francisco (1979).
- WAT, C.-K., STEFFENS, P., ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of Norreticuline-N-Methyltransferase from Berberis Cell Suspension Cultures. Z. Naturforschung, Teil c, im Druck.

- WEETALL, H.H.: Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. In: Methods in Enzymol. 44. Mosbach, K. (ed.) Acad. Press New York (1976) 134-148.
- WEILER, E.W.: Immunoassay of Plant Constituents. Biochem. Society Transactions, Vol. 11 (1983) 485-495.
- WESTERHOFF: Organization in The Cell Soup. Nature 318 (1985) 106.
- WHEELER, J.W., OLUBAJO, O., STORM, C.B., DUFFIELD, R.M.: Anabaseine: Venom Alkaloid of Aphaenogaster Ants. Science 211 (1981) 1051-1052.
- WIECZOREK, U.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Opiumalkaloiden in Papaver-Pflanzen und -Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1985).
- WIERMANN, R.: Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 7. Conn, E. (ed.) Acad. Press New York London Toronto Sydney San Francisco (1981) 85-116.
- WINK, M., HARTMANN, T.: Cadaverin-Pyruvate Transamination: The Principal Step of Enzymatic Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Lupinus polyphyllus Cell Suspension Cultures. FEBS Lett. 101 (1979) 343-346.
- WINK, M., HARTMANN, T., SCHIEBEL, H.M.: A Model Mechanism for the Enzymatic Synthesis of Lupin Alkaloids. Z. Naturforschung 34 c (1979) 704-708.
- WINTERSTEIN, E., TRIER, G.: Die Alkaloide. Bornträger Berlin (1910).
- YAMADA, Y., OKADA, N.: Biotransformation of Tetrahydroberberine to Berberine by Enzymes Prepared from Cultured Coptis japonica Cells. Phytochemistry 24 (1985) 63-65.
- ZAKS, A., KLIBANOV, A.M.: Enzyme-catalyzed Processes in Organic Solvents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 3192-3196.
- ZENK, M.H., DEUS, B.: Natural Product Synthesis by Plant Cell Cultures. In: Plant Tissue and Cell Culture. 1982. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.) Tokyo (1982) 391-393.
- ZENK, M.H., RÜFFER, M., AMANN, M., DEUS-NEUMANN, B.: Benzyl-isoquinoline Biosynthesis by Cultivated Plant Cells and Isolated Enzymes. J. Nat. Prod. 48 (1985) 725-738.

DANKSAGUNG

Die wissenschaftliche wie auch menschliche Auseinandersetzung mit Prof. Dr. M. H. Zenk waren für mich mit die wertvollsten Erfahrungen, die ich machen durfte. Ihm, meinem verehrten Lehrer, danke ich auf das herzlichste.

Rat und Tat, aber mehr noch die persönliche Anteilnahme aller meiner Kollegen an mir und STOX, die Geduld der Damen des Zellkulturlabors und die hilfreiche Unterstützung in ultrastrukturellen Fragestellungen durch Gerhard Wanner haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Das Verständnis, das meine Familie und Freunde für meine "jahrelange Abwesenheit" zeigten, kann ich nicht hoch genug schätzen, danke!

LEBENS LAUF

Am 18. September 1955 wurde ich, Manfred Amann, als zweites Kind des Forstamtmanns Werner Amann und seiner Ehefrau Erika, geb. Fischer, in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in den Jahren 1961 bis 1965 trat ich in das Albert-Einstein-Gymnasium in München ein, wo ich im Mai 1974 das Abitur ablegte.

Dem Wehrdienst schloß sich ab dem Wintersemester 1975/76 das Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München an. Die Diplom-Hauptprüfung legte ich im August 1982 ab und begann im September des gleichen Jahres unter Anleitung von Prof. Dr. M. H. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Seit dieser Zeit bin ich am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

Wir fühlen, daß selbst, wenn alle möglichen wissenschaftlichen Fragen beantwortet sind, unsere Lebensprobleme noch gar nicht berührt sind. Freilich bleibt dann eben keine Frage mehr; und eben dies ist die Antwort.

(L. Wittgenstein, Tractatus 6.52)

